

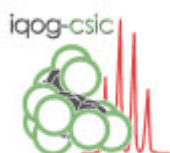


FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**“ENLACES DE HIDRÓGENO COOPERATIVOS EN LA
INTERACCIÓN CARBOHIDRATO-ADN ”**

Memoria que presenta
MARÍA TERESA BLÁZQUEZ SÁNCHEZ
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas

Directora de la Tesis: Dra. Cristina Vicent Laso



INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL, C.S.I.C.,
Madrid, Mayo 2014

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Síntesis, Estructura y Propiedades de los Compuestos Orgánicos (SEPCO) del Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C., bajo la dirección de la Dra. Cristina Vicent Laso.

El trabajo ha estado financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, dentro de los proyectos “Estructura, conformación, dinámica y reconocimiento molecular de carbohidratos. Una visión utilizando RMN” (MEC, CTQ2006-10874-C02-02) y “La interacción específica de carbohidratos y análogos con receptores biomoleculares. Ácidos nucleicos” (MICINN, CTQ2009-10547).

María Teresa Blázquez Sánchez ha sido financiada por:

Beca asociada a Proyecto Intramural Especial del CSIC. Instituto de Química Orgánica General. CSIC. Madrid.

Beca de Formación de Personal Investigador (FPI). Concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia. Referencia: BES-2008-007683

Beca de estancia predoctoral asociada a la beca de Formación de Personal Investigador (FPI) Georgia Institute of Technology (Gatech). Atlanta. USA. En el grupo del Prof. Loren Dean Williams. Concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	i
NOMENCLATURA Y NUMERACIÓN.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia del estudio de la interacción carbohidrato-ADN.....	8
1.2. Interacciones de Enlace de Hidrógeno (EH). Participación en procesos de reconocimiento molecular.....	12
1.2.1. Definición y propiedades de los EHs.....	13
1.2.2. Factores que modifican la fortaleza de los EHs: Interacciones electrostáticas y cooperatividad.....	15
1.2.3. EHs en carbohidratos.....	19
1.2.4. EHs en procesos de reconocimiento molecular con el ADN.....	25
1.3. Diseño de glico-oligoamidas con carbohidratos que contienen centros dadores de EH cooperativos.....	37
1.4. Referencias.....	56
2. OBJETIVOS.....	63
2.1. Objetivos sintéticos.....	63
2.1.1. Síntesis de glico-oligoamidas que contienen carbohidratos con centros dadores de EH cooperativos: β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1) y β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2).....	63
2.1.2. Síntesis de glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie L con centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos: β -L-Man-Py- γ -Py-Ind (7) y β -L-Gal-Py- γ -Py-Ind (8).....	65
2.2. Objetivos estructurales: : estudio conformacional de las glico-oligoamidas 1-4 y 7-9 en disolución acuosa por RMN.....	65
2.3. Caracterización de EHs intramoleculares en glico-oligoamidas β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1) y β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2) en medio acuoso mediante RMN.....	65
2.4. Interacción con el ADN.....	65
2.4.1. Estudios de interacción de las glico-oligoamidas 1-4 y 7-9 con polímeros de ADN por RMN.....	65
2.4.2. Estudios estructurales estructurales de los complejos de las glico-	

oligoamidas con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT) ₂ por RMN.....	67
2.4.3. Determinación de un orden relativo de afinidades de las glico- oligoamidas con poly(dA-dT) ₂ mediante ¹ H-RMN.....	67
3. SÍNTESIS DE LAS GLICO-OLIGOAMIDAS β-D-Tal-Py-γ-Py-Ind (2), β-L-Man-Py-γ-Py-Ind (7), β-L-Gal-Py-γ-Py-Ind (8) Y EL MODELO DE HEBRA AZÚCAR β-D-Tal-Py-NHAc (6).....	69
3.1. Introducción.....	69
3.1.1. Azúcares <i>raros</i>	70
3.1.3. Síntesis de oligoamidas heteroarómicas.....	75
3.1.4. Síntesis de glico-oligoamidas en disolución.....	76
3.2. Empleo de la Ruta A. Preparación de los derivados acetilados de las glico- oligoamidas β-D-Tal (2), β-L-Man (7) y β-L-Gal (8). (Azúcar-NH ₂ (II) + HO-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (18)). Ruta Lineal.....	79
3.2.1. Preparación del compuesto BtO-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (19).....	80
3.2.2. Preparación de las aminas anoméricas II: (AcO) ₄ -β-D-Tal-NH ₂ (28), (AcO) ₄ -α/β-L-Man-NH ₂ (32.a/32.b) y (AcO) ₄ -β-L-Gal-NH ₂ (36).....	82
3.2.2.1. Preparación de (AcO) ₄ -β-D-Tal-NH ₂ (28).....	83
3.2.2.2. Preparación de (AcO) ₅ -α/β-L-Man-NH ₂ (32.a/32.b) y (AcO) ₅ - β-L-Gal-NH ₂ (36).....	87
3.2.3. Preparación de las aminas anoméricas II.....	91
3.3. Empleo de la Ruta B. Preparación de los glico-oligoamidas β-D-Tal (2), β-L-Man (7) y β-L-Gal (8). (Azúcar-Py ^B -NO ₂ + HO-Py ^A -Ind). Ruta convergente.....	94
3.3.1. Preparación del 2-ácido carboxílico N-Metil pirrol. HO-Py ^B -NO ₂ (42)...	95
3.3.2. Preparación de los glico-nitropirroles III. Azúcar-Py ^B -NO ₂	95
3.3.3. Preparación de los derivados acetilados (AcO) ₄ -β-D-Tal-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (37), (AcO) ₄ -β-L-Man-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (38), y (AcO) ₄ -β-L-Gal-Py ^B -γ- Py ^A -Ind (39) por la Ruta B.....	98
3.3.4. Reacción de desacetilación.....	100
3.3.5. Preparación del modelo de hebra azúcar β-D-Tal-Py-NHAc (6).....	101

3.4.	Comparación de las Rutas A y B para la preparación de las glico-oligoamidas β -D-Tal (2), β -L-Man (7) y β -L-Gal (8).....	102
3.5.	Conclusiones.....	106
3.6.	Referencias.....	107
4.	CARACTERIZACIÓN DE ENLACES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN GLICO-OLIGOAMIDAS β-D-Man-Py-γ-Py-Ind (1) Y β-D-Tal-Py-γ-Py-Ind (2) LIBRE EN DISOLUCIÓN ACUOSA POR RMN.....	111
4.1	Estudios conformacionales para la determinación de la estructura en horquilla de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4).....	113
4.1.1.	Asignación de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4) en H ₂ O a baja temperatura.....	114
4.1.2.	Determinación de la estructura plegada de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4) mediante RMN: estudio de nOes y desplazamientos químicos.....	118
4.1.3.	Determinación de la conformación del enlace amido-glicosídico.....	126
4.1.4.	Plegamiento de las glico-oligoamidas 1-4 y definición de los centros que determinan los arcos NH y N-Metilo.....	129
4.2.	Caracterización de EHS intramoleculares en las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Tal (2) en H ₂ O a baja temperatura.....	134
4.2.1.	Detección y asignación de las resonancias de los protones intercambiables de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4) y los modelos de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6) en H ₂ O a baja temperatura.....	134
4.2.2.	Análisis de los parámetros de RMN (J, $\Delta\delta$ y $\Delta\delta/\Delta T$ y nOes) de los protones intercambiables, obtenidos en H ₂ O a baja temperatura para la caracterización de EHS intramoleculares de las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Tal (2).....	140
4.2.3.	Comparación de β -D-Man (1) vs β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal (2) vs β -D-Tal-Py-NHAc (6).....	145
4.3.	Cálculos computacionales.....	148

4.3.1.	Cálculos de Mecánica Molecular (MM) y Dinámica Molecular (DM) de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4).....	149
4.3.2.	Cálculos <i>ab initio</i>	153
4.4.	Conclusiones.....	155
4.5.	Referencias.....	157
5.	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DELAS GLICO-OLIGOAMIDAS CON POLÍMEROS DE ADN MEDIANTE RMN.....	159
5.1.	Estudios estructurales de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) en el estado libre en H ₂ O a 5 °C y en D ₂ O a 25 °C.....	159
5.2.	Estudio Estudio de de las glico-oligoamidas 1, 2, 7-9 con diferentes polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT) ₂ por RMN.....	165
5.2.1.	Unión al surco menor del ADN. Experimento de competición con netropsina.....	168
5.2.2.	Estudio de la selectividad de secuencia de las glico-oligoamidas por RMN con ct-ADN y poly(dA-dT) ₂	171
5.2.3.	Experimento DF-STD de competición entre β -D-Man (1) y β -D-Man-Py-NHAc (5) con poly(dA-dT) ₂	175
5.3.	Estudios estructurales de los complejos de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT) ₂	182
5.3.1.	Experimentos de nOe trasferido (TR-NOESY) de los complejos de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D- Man (9) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA- dT) ₂	184
5.3.2.	Experimentos de DF-STD de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L- Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) con poly(dA-dT) ₂ por ¹ H-RMN.....	194
5.4.	Determinación de las constantes de asociación. Valoraciones de las glico-oligoamidas β - D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8), 6-desoxy- β -D-Man (9) poly(dA-dT) ₂ por ¹ H-RMN.....	207

5.4.1.	Estudios de interacción mediante experimentos de competición entre dos ligandos con poly(dA-dT) ₂	218
5.5.	Conclusiones.....	223
5.6.	Referencias.....	226
6.	CONCLUSIONES GENERALES.....	229
6.1.	Síntesis.....	229
6.2.	Estudios conformacionales de las glico-oligoamidas en el estado libre en disolución acuosa.....	229
6.3.	Caracterización de EHs intramoleculares en H ₂ O.....	230
6.4.	Estudios de interacción.....	230
7.	PARTE EXPERIMENTAL:PREPARACIÓN DE LAS GLICO-OLIGOAMIDAS.....	233
7.1.	Materiales y métodos.....	233
7.2.	Preparación de las glico-oligoamidas β-D-Tal (2), β-L-Man (7) y β-L-Gal (8).....	237
7.2.1.	Preparación de los equivalentes sintéticos de las aminas anoméricas II....	237
7.2.1.1.	Preparación de 6-O-tritol-D-Galactosa (21).....	237
7.2.1.2.	Preparación de 6-O-tritol-D-Talosa (23).....	238
7.2.1.3.	Preparación de D-Talosa (25).....	239
7.2.1.4.	Preparación de (AcO) ₅ -β-D-Tal (26.b).....	240
7.2.1.5.	Preparación de (AcO) ₅ -α-L-Man (30.a).....	242
7.2.1.6.	Preparación de (AcO) ₅ -α-L-Gal (34.a).....	243
7.2.1.7.	Preparación de (AcO) ₄ -α-D-Tal-N ₃ (27.a).....	244
7.2.1.8.	Preparación de (AcO) ₄ -α-L-Man-N ₃ (31).....	245
7.2.1.9.	Preparación de (AcO) ₄ -α-L-Gal-N ₃ (35.a).....	246
7.2.2.	Preparación de las aminas anoméricas II.....	247
7.2.2.1.	Preparación de (AcO) ₄ - β-D-Tal-NH ₂ (28).....	247
7.2.2.2.	Preparación de (AcO) ₄ -α/β-L-Man-NH ₂ (32.a/32.b).....	248
7.2.2.3.	Preparación de (AcO) ₄ -β-L-Gal-NH ₂ (36).....	249
7.2.3.	Preparación de las derivados acetilados de las glico-oligoamidas β-L-Man (7) y β-L-Gal (8) por la ruta A.....	250
7.2.3.1.	Preparación de BtO-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (19).....	250
7.2.3.2.	Preparación Preparación de los derivados acetilados	

	(AcO) ₄ -β-L-Man-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (38) y (AcO) ₄ -β-L-Man-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (39) por la Ruta A.....	251
7.2.3.2.1.	Preparación de (AcO) ₄ -β-L-Man-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (38) por la Ruta A.....	251
7.2.3.2.2.	Preparación de (AcO) ₄ -β-L-Gal-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (39) por la Ruta A.....	253
7.2.4.	Preparación de las glico-oligoamidas β-D-Tal (2), β-L-Man (7) y β-L-Gal (8) por la Ruta B.....	254
7.2.4.1.	Preparación de HO-Py ^A -γ-Ind (15).....	254
7.2.4.2.	Preparación de los equivalentes sintéticos de la hebra azúcar... 7.2.4.2.1. Preparación de (AcO) ₄ -β-D-Tal-Py ^B -NO ₂ (43).....	255
	7.2.4.2.2. Preparación de (AcO) ₄ -α/β-L-Man-Py ^B -NO ₂ (44.a/44.b).....	256
	7.2.4.2.3. Preparación de (AcO) ₄ -β-L-Gal-Py ^B -NO ₂ (45)....	257
7.2.4.3.	Preparación de los derivados acetilados (AcO) ₄ -β-D-Tal-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (37), (AcO) ₄ -β-L-Man-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (38) y (AcO) ₄ -β-L-Gal-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (39) por la Ruta B.....	258
7.2.4.3.1.	Preparación de (AcO) ₄ -β-D-Tal-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (37) por la Ruta B.....	258
7.2.4.3.2.	Preparación de (AcO) ₄ -β-L-Man-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (38) por la Ruta B.....	259
7.2.4.3.3.	Preparación de de (AcO) ₄ -β-L-Gal-Py ^B -γ-Py ^A -Ind (39) por la Ruta B.....	259
7.2.4.4.	Reacción de desacetilación.....	260
7.2.4.4.1.	Preparación de β-D-Tal-Py-γ-Py-Ind (2).....	260
7.2.4.4.2.	Preparación de β-L-Man-Py-γ-Py-Ind (7).....	261
7.2.4.4.3.	Preparación β-L-Gal-Py-γ-Py-Ind (8).....	262
7.3.	Preparación del modelo de hebra azúcar β-D-Tal-PyB-NHAc (6).....	263
7.3.1.	Preparación de HO-Py ^B -NO ₂ (42).....	263
7.3.2.	Preparación del modelo de hebra azúcar β-D-Tal-Py-NHAc (6) por la Ruta B.....	263
7.3.2.1.	Preparación de (AcO) ₄ -β-D-Tal-Py ^B -NHAc (46).....	263

7.3.2.2.	Preparación de β -D-Tal-Py-NHAc (6).....	264
7.4.	Preparación de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4), 6-desoxy- β -D-Man (9) y el modelo de hebra azúcar β -D-Man-Py ^B -NHAc (5).....	265
7.5.	Referencias.....	270
8.	PARTE EXPERIMENTAL: ESTUDIOS DE INTERACCIÓN.....	271
8.1.	General.....	271
8.2.	Instrumentación.....	271
8.3.	Caracterización estructural de de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4) y sus modelos de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6) en disolución acuosa mediante RMN a baja temperatura.....	272
8.3.1.	Preparación de las disoluciones utilizadas en los experimentos de RMN a -15°C	272
8.3.2.	Asignación del espectro de ^1H -RMN y estudio conformacional de las glico-oligoamidas 1-4 y los modelos de hebra azúcar 5 y 6.....	272
8.3.3.	Experimentos de dilución de las glico-oligoamidas 1 y 2 por ^1H -RMN a 5°C	273
8.3.4.	Experimentos para la caracterización de enlaces de hidrógeno por RMN a baja temperatura.....	273
8.4.	Caracterización estructural de las glico-oligoamidas 1, 2, 7-9 por RMN a temperatura ambiente y a 5°C	274
8.4.1.	Preparación de las muestras utilizadas en los experimentos de RMN a 25 y 5°C	274
8.4.2.	Asignación del espectro de ^1H -RMN y estudio conformacional de las glico-oligoamidas 1, 2, 7-9.....	275
8.5.	Estudio de la interacción de las glico-oligoamidas 1-4 y 7-9 con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT) ₂ mediante RMN.....	276
8.5.1.	Medida de las concentraciones de los polímeros de ADN mediante espectroscopía UV/Vis.....	276
8.5.2.	Preparación de los complejos con ct-ADN y poly (dA-dT) ₂	278
8.5.3.	Unión al surco menor del ADN. Experimento de competición con netropsina.....	278

8.5.4.	Estudios de de selectividad de secuencia: Valoraciones de la glico-oligoamida β -D-Man (1) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT) ₂	279
8.5.5.	Experimento de competición por DF-STD entre β -D-Man (1) y β -D-Man-Py-NHAc (5) con poly(dA-dT) ₂	280
8.6.	Estudios estructurales de los complejos de las glico-oligoamida con polímeros de ADN.....	281
8.6.1.	Experimentos de nOe transferido (TR-NOESY) de los complejos glico-oligoamida-ADN.....	282
8.6.2.	Experimentos DF-STD de los complejos glico-oligoamida-ADN.....	283
8.7.	Determinación de las constantes de asociación: Valoraciones de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) con poly(dA-dT) ₂ por ¹ H-RMN.....	286
8.7.1.	Experimentos de competición entre dos ligandos con poly(dA-dT) ₂	289
8.8.	Referencias.....	290
9.	ANEXO.....	291

Abreviaturas y acrónimos^a

A	adenina
ADN o DNA	ácido desoxirribonucleico
Ac	acetilo
AcO	acetato
Ar	arilo, protones aromáticos
anh.	disolvente anhidro
aq.	disolución acuosa
<i>API-ES</i>	<i>atmospheric pressure ionization electrospray experiment</i>
bp	pares de bases, <i>base pair</i>
BP	tampón fosfato 6.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 3.9 mM NaH ₂ PO ₄
BPS	tampón fosfato 6.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 3.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM NaCl
C	citosa
COSY	<i>Correlated Spectroscopy experiment</i>
<i>ct</i> -ADN	<i>calf thymus</i> ADN
cuant.	cuantitativo
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCU	diciclohexilurea
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer experiment</i>
Desoxy-man	desoximanosa
DF-STD	<i>Differential-Frequency Saturation Transfer Difference experiment</i>
DIEA	diisopropiletilamina
disol.	disolución
DIPC	diisopropilcarbodiimida
DIPU	diisopropilurea
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
ec.	ecuatorial
EHs	enlaces de hidrógeno
E.M.	espectrometría de masas
eq.	equivalente

^a Coghill, A. M.; Garson, L. R. *The ACS Style Guide. Effective Communication of Scientific Information*; Ed. Washington, DC: American Chemical Society ; Oxford ; New York : Oxford University Press, 3^a Ed. 2006.

Et	etilo
Fuc	fucosa
G	guanina
Gal	galactosa
Glc	glucosa
GS	grupo saliente
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation experiment</i>
Hp	hidroxipirrol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución “ <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> ”
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation experiment</i>
Im	imidazol
Ind	indol
IR	espectroscopía de infrarrojo
Man	manosa
nOe	efecto nuclear Overhauser
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy experiment</i>
PEG	polietilenglicol
P.f.	punto de fusión
Ph	fenilo
Py	2-carboxi- <i>N</i> -metil pirrol
py	piridina
Py-NHAc	2-carboxy- <i>N</i> -metil pirrol-4-acetamido
ref.	referencia bibliográfica
rto.	rendimiento
¹ H-RMN	resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C-RMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN	resonancia magnética nuclear
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy experiment</i>
sat.	disolución saturada
sist.	sistema
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
T	temperatura
t.a.	temperatura ambiente
Tal	talosa

THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
TFFH	hexafluorofosfato de tetrametilfluoroamidinio
TMSCl	trimetilclorosilano
TLC	Cromatografía en capa fina “ <i>Thin Layer Chromatography</i> ”
T _m	Tiempo de mezcla
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy experiment</i>
TR-NOESY	transfer NOESY experiment
UV/Vis	ultravioleta/visible
γ	derivado del ácido γ-aminobutírico

Nomenclatura y Numeración^a

Para un mejor seguimiento de la lectura de esta memoria, algunos de los compuestos, serán nombrados con independencia de las reglas IUPAC y según las abreviaturas indicados en el apartado de *Abreviaturas y acrónimos*.

Nomenclatura y Numeración para el fragmento de oligoamida -Py- γ -Py-Ind.

Se empleará Py para referirse al pirrol, Ind para el indol y γ para el fragmento derivado del ácido γ -aminobutírico. El pirrol unido al anillo del indol será nombrado como Py^A y el otro pirrol se denominará como Py^B. Debido a la importancia de los NH, se numerarán empezando a partir del NH del indol, siendo éste el NH-1. La numeración empleada para los átomos, tanto de los pirroles como del indol, será la recomendada por la IUPAC.^b Para la numeración del fragmento derivado del ácido γ -aminobutírico, se utilizarán las letras a, b, c. Por lo tanto, la nomenclatura y numeración utilizada en este trabajo para el fragmento de oligoamida de estructura general -Py- γ -Py-Ind será la indicada a continuación (Figura 1):

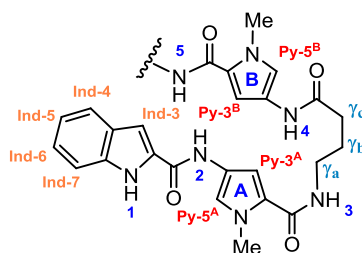


Figura 1. Numeración para el fragmento de oligoamida -Py^B- γ -Py^A-Ind. En azul se indica el nombre para cada pirrol (A y B). La numeración de los hidrógenos de los pirroles se indica en rojo y la de los hidrógenos del indol en naranja. Los NHs se numeran a partir del NH del indol, siendo éste el NH-1 y se indica en azul.

También, se denominará a los compuestos que posean en su estructura un fragmento de pirrol B *N*-acetilado en posición 4. (Figura 2).

^a Fernández, E.; Fariña, F. *Nomenclatura de la química orgánica (IUPAC). Secciones A, B, C, D, E, F y H.*; C.S.I.C. y Real Sociedad Española de Química, Madrid, **1987**.

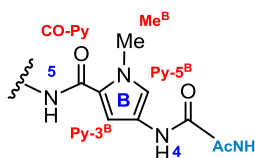


Figura 2. Numeración del modelo de hebra azúcar.

Así las glico-oligoamidas están constituidas por dos hebras: la *hebra indol* que es aquella que contiene el indol, el pirrol A y el derivado del ácido aminobutírico (γ) y la *hebra azúcar* que es la constituida por el residuo sacarídico y el pirrol B *N*-acetilado en posición 4. (Ver Figura 3).

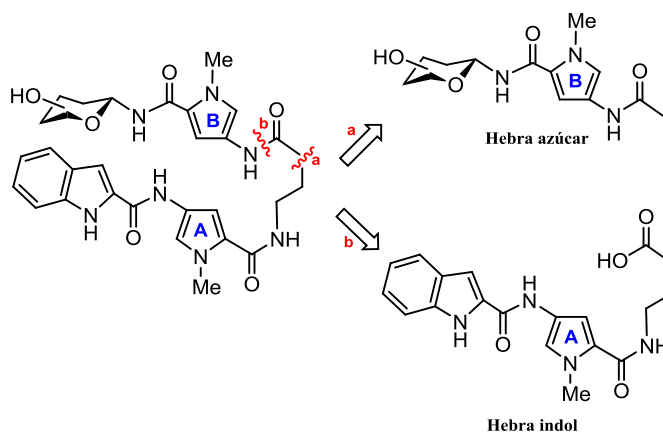


Figura 3. Hebra azúcar y hebra indol.

Por último, para referirnos a las dos conformaciones extremas que pueden presentar los compuestos se utilizará la terminología de *conformación abierta* para referirnos a aquella conformación en la que la molécula posee una conformación totalmente extendida y la *conformación horquilla* en la que la molécula tiene los dos pirroles enfrentados y el azúcar enfrentado al indol pudiéndose establecer interacciones intramoleculares. (Figura 4).

^b Estas reglas aparecen enumeradas en la sección R-2 de la versión más reciente IUPAC 'Blue Book'. H.R.Panico, W.H.Powell, J.C.Richer *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations 1993*; Blackwell Scientific: Oxford, 1993; the previous IUPAC Blue Book: J.Rigandy, S.P.Klesney *Nomenclature of Organic Chemistry*; Pergamon: Oxford, 1979.

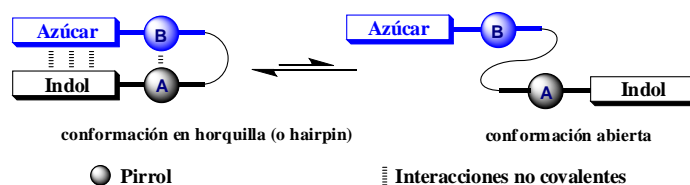


Figura 4. Conformaciones en horquilla y abierta de los compuestos.

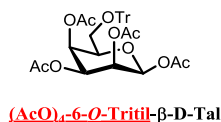
Nomenclatura para los fragmentos sacarídicos de amino azúcares y sus equivalentes sintéticos.

En el transcurso de la síntesis de los amino azúcares tanto de la serie D como de la serie L se obtienen intermedios, (equivalentes sintéticos de los amino azúcares), derivados de las formas piranosas y/o furanosas en su configuración anómerica α y/o β . Estos derivados pueden obtenerse en disolución en forma de un único confórmero con una configuración anómerica determinada o bien en forma de mezclas conformacionales y/o anómicas.

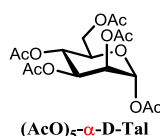
Así podemos obtener mezclas de formas piranosas y furanosas con configuraciones α y/o β en diferentes proporciones.

La nomenclatura de los aminoazúcares y sus equivalentes sintéticos que se va utilizar en esta tesis es la siguiente:

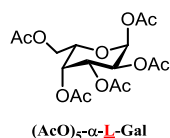
1. Descripción de los sustituyentes de los grupos OH de forma abreviada por orden alfabético de las posiciones 2, 3, 4 y 6 del carbohidrato. Como ejemplo se muestra el siguiente derivado de talosa.



2. Descripción de la stereoquímica del centro C-1: configuración α ó β

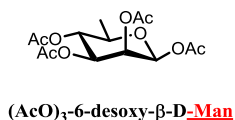


3. Descriptor de la configuración en C-5 del carbohidrato: serie D (configuración *R*) o serie L (configuración *S*).

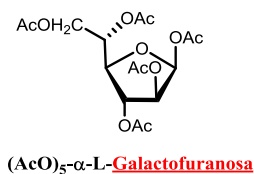


4. Nombre abreviado o completo del residuo de azúcar:

- a. Si se trata de un anillo de piranosa en su forma anómerica pura α ó β se designará con el nombre abreviado.



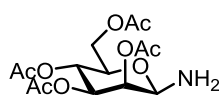
- b. Para referirnos a anillos furanoides se incluirá la terminación furanosa.



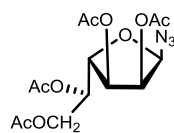
- c. Para referirnos a una mezcla de conformeros de furanosas y piranosas se empleará el nombre completo del carbohidrato, sin indicar si es furanosa o piranosa. Por ejemplo, el compuesto (AcO)₅-**D-Talosa** se referirá a una mezcla de anillos piranoides y furanoides cuya configuración anomérica puede ser α y/o β. Siempre que sea posible, a continuación del nombre se indicará la proporción de anómeros α o β de cada conformero piranoide y furanoide en cada caso.



5. Finalmente se describe el sustituyente del centro anómérico C-1 abreviado (excepto si se trata de un grupo acetato).



(AcO)₄-β-D-Tal-**NH₂**



(AcO)₄-β-D-Talofuranosa-**N₃**

1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y DISEÑO DE LAS MOLÉCULAS OBJETO DE ESTUDIO.

Una de las diferencias estructurales más relevantes entre los carbohidratos y otras biomoléculas es que los primeros presentan la posibilidad de una gran variedad de tipos de uniones entre sus unidades constituyentes (monosacáridos). Por otra parte, pueden estar altamente ramificados, teniendo de este modo acceso a un número casi infinito de variaciones estructurales.

El reconocimiento de los carbohidratos por otras biomoléculas conlleva la decodificación de la información existente en la estructura de los carbohidratos. Estos procesos de reconocimiento originan respuestas biológicas tales como el transporte intracelular, la eliminación de glico-proteínas y células del sistema circulatorio, los procesos de adhesión microbiana, el reconocimiento de antígenos, la simbiosis entre bacterias y plantas, etc. ^[1]

Diferentes técnicas biofísicas (Rayos-X y RMN fundamentalmente) han permitido obtener información detallada acerca de la estructura tridimensional de los complejos formados por los carbohidratos y otras biomoléculas. Estos datos estructurales han permitido postular cuáles son las fuerzas intermoleculares responsables de los procesos de reconocimiento en los que participan los carbohidratos.

Las interacciones no covalentes implicadas son interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno (EHs), interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals. El conocimiento de la contribución relativa de cada una de ellas es de fundamental importancia, no sólo para explicar estos procesos a escala molecular, sino también para el diseño racional de carbohidratos o glicoconjugados con actividades biológicas específicas.

Con bastante frecuencia otras moléculas se encuentran también implicadas en la formación de los complejos. Por ejemplo, se ha observado la presencia de moléculas de agua localizadas, tanto en el sitio de reconocimiento, como en la superficie de una proteína. Éstas proporcionan interacciones adicionales que ayudan a estabilizar el complejo y a conseguir una mayor selectividad. ^[2] Además se ha visto que determinados cationes son de fundamental importancia para el establecimiento de los complejos entre carbohidratos y lectinas de leguminosas y en C-lectinas de origen animal. ^[2-3]

La importancia relativa de cada tipo de interacción no covalente es una cuestión que aún permanece abierta al debate. No obstante, parece probable que, por lo que al carbohidrato se refiere, la contribución relativa de las mismas serán función de la topología del azúcar, o lo que es lo mismo, de la configuración relativa de los grupos hidroxilo en cada una de las unidades monosacáridicas constituyentes (figura 1.1); y, por supuesto, del medio en el que el proceso de reconocimiento tenga lugar.

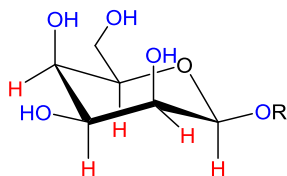


Figura 1.1. Configuración relativa de los grupos hidroxilo en el anillo de piranosa que determina la topología del carbohidrato. En este caso, es el origen de la existencia de dos caras de distinta polaridad en la molécula de talosa. Se marcan en rojo los grupos hidroxilo (cara polar) y en verde los CH (cara hidrófoba).

Considerando el elevado número de grupos hidroxilo (OHs) presente en los azúcares, no parece improbable la participación de estos grupos funcionales en EHs en los diferentes procesos de reconocimiento molecular. Por lo tanto, el conocimiento de la energética de esta interacción en los carbohidratos es de enorme interés. La contribución energética de los EHs en medios fisiológicos es una cuestión muy debatida, sin embargo, parece haber cierto consenso en que su mayor direccionalidad,^[4] comparado con otras fuerzas no covalentes, permitiría a los EHs jugar un papel importante en la selectividad y especificidad del reconocimiento.

En el mapa de EH que aparece en la figura 1.2 para el reconocimiento de un monosacárido por una proteína,^[5] se observa la importancia de las redes conjugadas de EH en el reconocimiento de los carbohidratos.

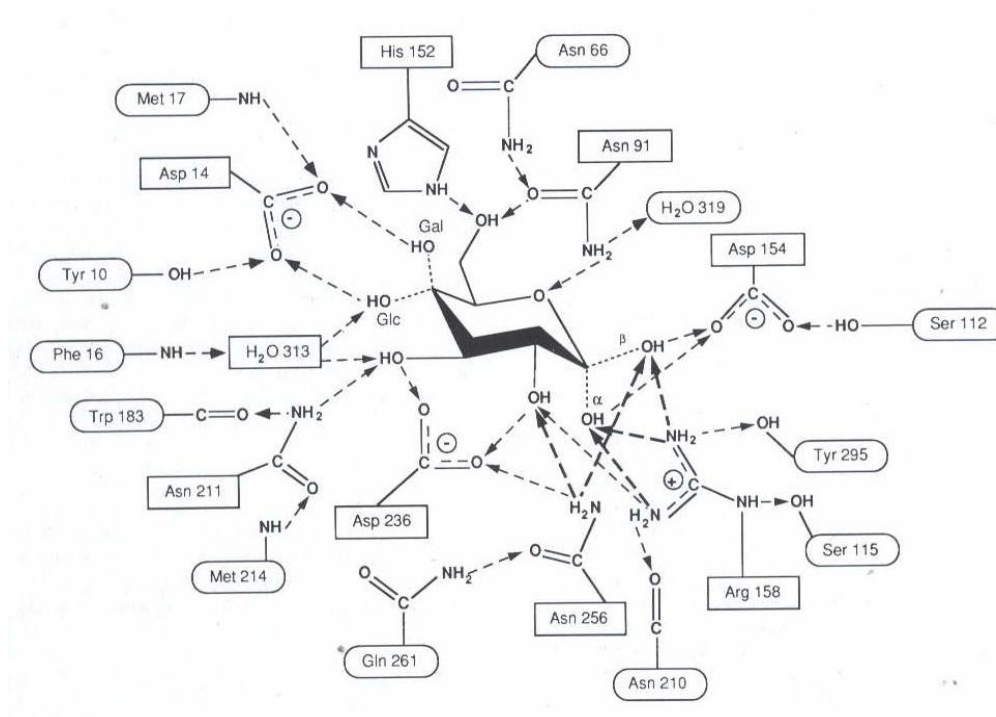


Figura 1.2. Mapa de los EH establecido entre la proteína GGBP y α/β -D-glucosa y los correspondientes epímeros de galactosa. Las cajas rectangulares indican los residuos primarios que interaccionan directamente con el azúcar, y las cajas ovaladas, los residuos secundarios que interaccionan con los primarios. (Figura obtenida de Vyas, N. K. Curr, Opin, Struct. Biol, 1991, 1, 732-740).

Así, esta tesis se ha concebido como un intento de clarificar cómo los carbohidratos utilizan el lenguaje de los EHs como medio de interacción, en disolución acuosa, para ser reconocidos por otras biomoléculas, en concreto, por el ADN.

En los carbohidratos neutros, no sólo las interacciones de EH cobran importancia en procesos de reconocimiento molecular. La topología de los carbohidratos también permite su unión con otras biomoléculas a través de interacciones CH- π .

Las interacciones CH- π ^[6] son fuerzas moleculares débiles cuyas propiedades y características se han venido estudiando en las últimas dos décadas. Así se ha mostrado que dicha fuerza, (Figura 1.3), juega un papel significativo en química orgánica: estudios de conformación^[6-7], empaquetamiento cristalino^[8], química receptor/huésped^[9], selectividad de reacción^[10] y fenómenos bioquímicos^[6,11].

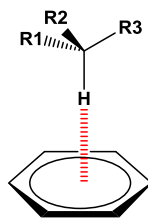


Figura 1.3 Representación de interacción CH- π

En 1977, se presentó la hipótesis de que las interacciones CH- π involucrando CHs alifáticos como donadores de hidrógeno presentan implicaciones en una gran variedad de procesos moleculares, químicos^[12] y bioquímicos.^[11] Así, esta interacción contribuye significativamente a la estabilidad de la estructura de proteínas^[13], el reconocimiento selectivo y la afinidad de unión entre proteínas y ligandos^[14], la preferencia conformacional del ADN,^[15] la estereoselectividad de reacciones orgánicas^[10] y el reconocimiento molecular.^[16]

En las interacciones CH- π que involucran grupos CH sp³ y sp² como donadores de hidrógeno, la estabilización de los complejos^[17] (1.5-2.5 Kcal/mol) viene, esencialmente, de las fuerzas de dispersión. La medida de su fortaleza y su alcance es muy importante; dichas interacciones han sido investigadas cualitativamente, tanto en disolventes orgánicos como en agua, a través de estudios de mutación de proteínas^[14a], estudios mediante el empleo de técnicas como IR^[18], RMN^[19], cristalografía de rayos-X^[8] y métodos computacionales^[20], sin embargo, la cuantificación de tales interacciones no es trivial y hay sólo unos pocos estudios en esta área^[21].

La naturaleza de las interacciones CH- π es considerablemente diferente a la de los EH convencionales. En 1993 Sakaki sugirió que la mayor fuente de atracción en las interacciones CH- π es la interacción de dispersión siendo la contribución electrostática pequeña, mientras que, el origen electrostático es responsable de la atracción en los EH convencionales principalmente.^[22] Sin embargo, una característica común de las interacciones CH- π con los EHs es la direccionalidad y cooperatividad.^[23]

Se han obtenido evidencias de la existencia de EH CH- π mediante diferentes métodos experimentales,^[6] incluyendo determinaciones calorimétricas,^[24] análisis CSD,^[25] dicroísmo circular,^[26] en estructuras cristalinas,^[27] datos espectroscópicos de RMN^[19] entre otros^[28].

A día de hoy existen ya numerosos estudios que demuestran que las interacciones CH- π cobran especial importancia en multitud de procesos de reconocimiento molecular^[11]. A

pesar de la alta naturaleza hidrofílica de muchos azúcares, los anillos aromáticos de los receptores, (como por ejemplo en proteínas y ácidos nucleicos), a menudo juegan un importante papel en estos procesos. Más concretamente, la presencia de amino ácidos aromáticos en los sitios de unión del carbohidrato de las proteínas fue ya observada en complejos enzima-oligosacárido.^[29] Así la importancia de residuos de triptófano para la unión de carbohidratos fue destacada por Phillips en 1971 por experimentos de RMN.^[30] Más tarde en 1986, Quicho,^[31] estudió complejos carbohidrato-proteína y propuso interacciones de stacking aromático-carbohidrato como una característica común para el reconocimiento de carbohidratos.^[31-32] Por todo ello han sido, hasta la fecha, numerosos los estudios de sistemas modelo de interacción carbohidrato-aromático.^[24,33] Con estos sistemas sencillos, se ha observado, que dicha interacción no sólo depende de la naturaleza del azúcar y de la estereoquímica de los átomos de carbono, sino también del disolvente.^[34]

Son múltiples los estudios de reconocimiento molecular entre carbohidratos y proteínas donde se ponen de manifiesto que las interacciones CH- π juegan un papel importante^[19,28,33a,33c,35]. (Ver Figura 1.4). En la figura a continuación se muestran dos ejemplos donde las interacciones CH- π gobiernan el reconocimiento molecular de carbohidratos por proteínas.

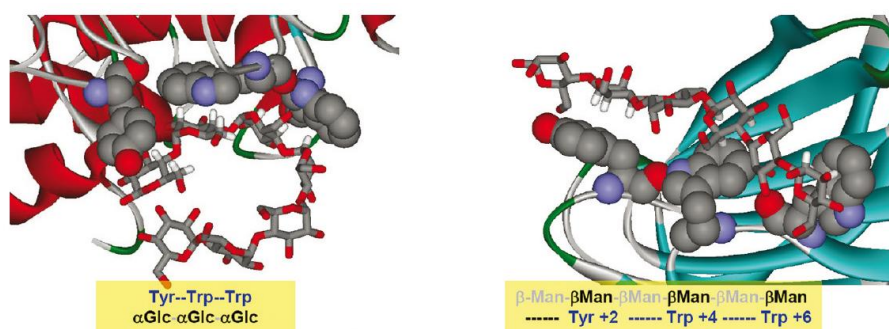


Figura 1.4 Ejemplos de sitios de unión de oligosacáridos en el centro de reconocimiento de proteínas. Maltoseptosa con proteína SusD^[36] (izquierda) y manohexosa con CBM29^[37] (derecha). Imágenes extraídas del artículo Asensio, J. L. Accounts. Chem. Res 2012, 46, 946-954.

Como puede verse en la figura, el anillo de indol del triptófano es la una de las unidades aromáticas por excelencia participante en los procesos de CH- π carbohidrato-proteína.

Por otro lado, estudios recientes han revelado que las interacciones carbohidrato/aromático no están restringidas a los complejos con proteínas, sino que, también, están presentes en complejos carbohidrato/ARN.^[38]

Así, la elucidación de las estructuras cristalinas de unidades de determinados ribosomas con aminoglicósidos ha puesto de manifiesto la relevancia de los anillos aromáticos como elementos clave para el reconocimiento de carbohidratos. (Figura 1.5).

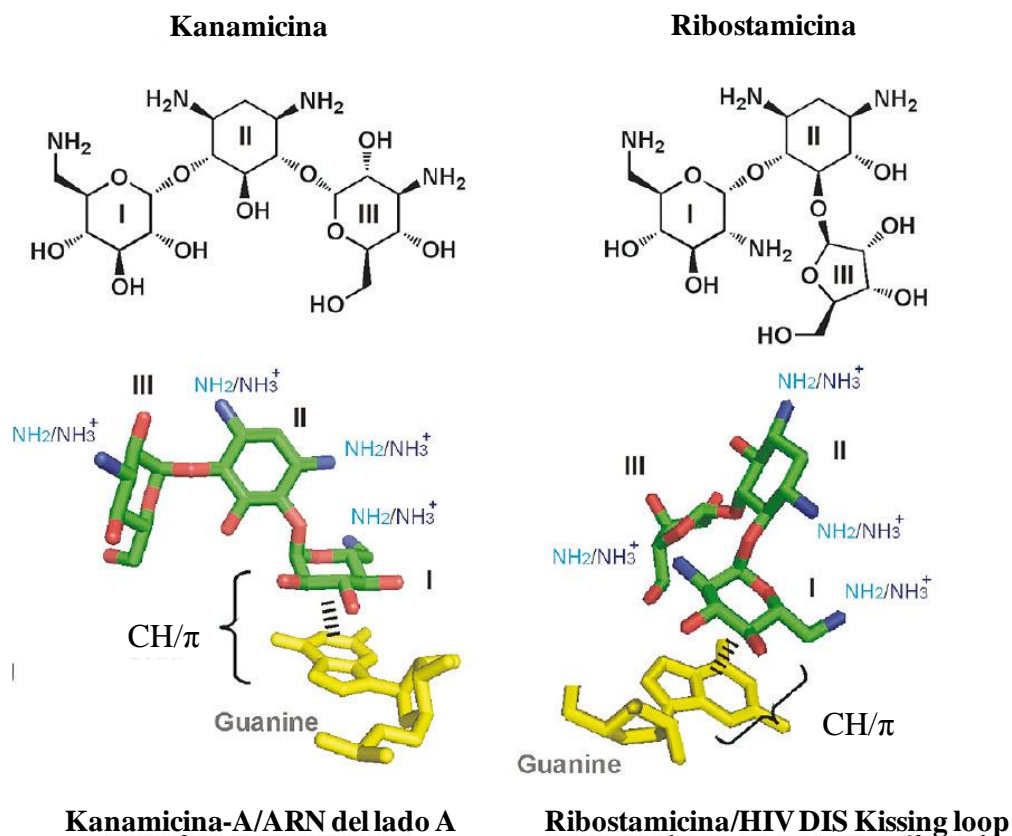


Figura 1.5 Representación de las interacciones de CH- π presentes en los respectivos complejos de la Kanamicina-A con el ribosoma del lado A^[38c] (izquierda) y de la Ribostamicina con el kissing-loop del virus VIH DIS^[39] (derecha). Esta figura ha sido extraída del artículo Asensio et al. JACS, 2010, 132, 12074.

En la figura 1.5 se muestra el reconocimiento del carbohidrato de animoglucosa por el anillo aromático de guanina en los diferentes complejos de ARN.

Por otro lado, estudios recientes han mostrado que, la incorporación de residuos de carbohidrato en posiciones terminales de la doble hélice de ADN, puede ser de gran utilidad

tanto para la medida de interacciones CH/ π carbohidrato/aromático^[40] como para alterar la topología del plegamiento.^[41]

En resumen, las interacciones de EH y CH- π son el origen del reconocimiento molecular de carbohidratos neutros por otras biomoléculas. En la figura a continuación se muestra un esquema de la coexistencia de ambas interacciones en el reconocimiento molecular con proteínas donde la molécula de triptófano juega un papel importante. (Ver Figura 1.6).

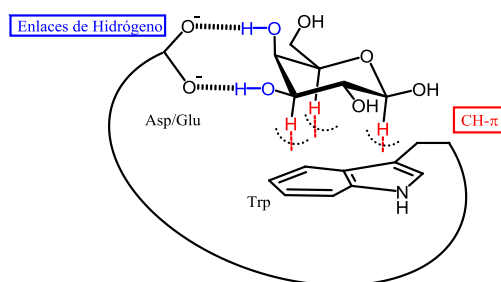


Figura 1.6. Co-existencia de interacciones de EH y CH- π en procesos de reconocimiento molecular.

Así, el desarrollo de modelos moleculares simples en los que participen tanto EHs como interacciones CH- π es extremadamente importante ya que permitiría la cuantificación de dichas interacciones y el estudio de la influencia de las mismas tanto en sistemas aislados como en procesos de reconocimiento molecular.

Más adelante veremos con detalle que, en los ligandos de ADN diseñados en nuestro grupo, las interacciones de EH y CH- π son responsables de la conformación de las glico-oligoamidas en disolución acuosa.

En concreto, el objetivo de esta tesis es la caracterización de redes de EH intramoleculares en agua para la generación de centros dadores de EH cooperativos y el estudio de su influencia en la interacción carbohidrato-ADN. Este objetivo se ha aplicado a determinadas glico-oligoamidas, (ligandos de ADN).^[42]

1.1. Importancia del estudio de la interacción carbohidrato-ADN.

La interacción carbohidrato-ADN es especialmente relevante dada la existencia de familias de fármacos que contienen carbohidratos en su estructura y cuya diana específica es el ADN,^[43] siendo el carbohidrato el responsable de la selectividad de secuencia.

Además, en los últimos años se ha venido constatando que la β -O-glicosilación con N-Acetilglucosamina (GlcNAc) de proteínas nucleares, que se unen al ADN, juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción.^[44] Así, los factores de transcripción son proteínas modificadas por β -O-GlcNAc que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes como por ejemplo el factor de transcripción PDX-1^[45] (figura 1.3), YY1^[46], ChREBP^[47] y CREB^[48] entre otros. En la figura 1.7, se representa un esquema de cómo en determinados factores de transcripción como YY1, la presencia de N-acetilglucosamina, (O-GlcNAc), unido al hidroxilo de L-serina o L-treonina activa la unión del factor de transcripción al ADN y regula la transcripción.

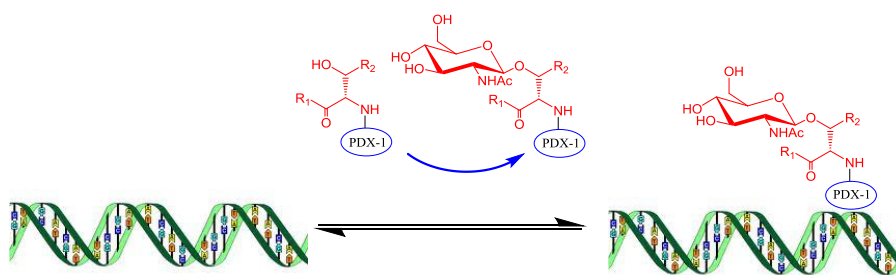


Figura 1.7 Esquema general de la actuación de un factor de transcripción como PDX-1.

Por otro lado, en las últimas décadas, la interacción de moléculas pequeñas con ADN ha suscitado un gran interés por la posible aplicación terapéutica. Así, se han estudiado una gran variedad de ligandos que contienen carbohidratos en su estructura y que se asocian al ADN.^[49] El primer ejemplo de unión al surco menor del ADN estudiado fue la calicheamicina γ_1^I .^[50] Se comprobó que el oligosacárido presente en su estructura es responsable tanto de la afinidad como de la selectividad de secuencia del fármaco.^[50a,51]

La calicheamicina γ_1^I es un miembro de la familia de antibióticos enodiónicos con actividad antitumoral que está constituida por una unidad bicíclica de endiño unida a un fragmento de ariltetrasacárido (figura 1.8).

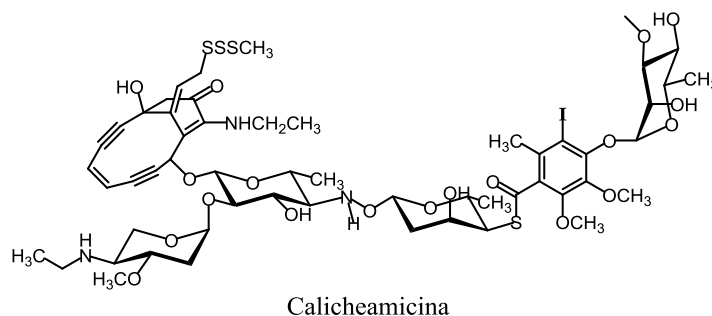


Figura 1.8 Calicheamicina γ_1^I

Estudios acerca de la selectividad de ruptura del ADN por parte de la calicheamicina mostraron que este ligando parece unirse a una variedad de secuencias de oligopirimidina/oligopurina que contienen tres o más pirimidinas seguidas como: CTTC, ATTC, y CTCT.^[50c] Se han realizado numerosos estudios destinados a conocer el origen de la selectividad de la calicheamicina en su asociación al ADN. Así, técnicas de RMN han demostrado que el antibiótico establece EH, con las bases y los grupos fosfato en el surco menor, a través de los grupos OH y el grupo etilamino presentes en el fragmento del oligosacárido.^[52] Se sabe también que, en el complejo, tienen lugar interacciones hidrófobas^[53] y de van der Waals^[54] entre las bases pirimídicas y el ariltetrasacárido. Por otro lado, las interacciones de naturaleza electrostática no parecen jugar un papel importante en la asociación.^[55] Así, en la actualidad, todavía se desconocen las bases moleculares que explican la selectividad de secuencia de este antibiótico, ya que se asocia a un conjunto de secuencias de diferente funcionalidad. El fragmento de ariltetrasacárido del antibiótico se asocia a las secuencias diana con una selectividad similar a la calicheamicina y ha resultado ser un ligando efectivo para el reconocimiento de determinadas secuencias de la doble hélice de ADN. El dímero del oligosacárido de la calicheamicina, que contiene el residuo de iodofenilo en su estructura, muestra una mayor afinidad ($K_d = 10^{-9}M$) por la secuencia TCCT en dúplex de ADN que el correspondiente análogo monomérico de calicheamicina ($K_d = 10^{-6}M$).^[56] De forma que, en la calicheamicina y sus derivados sintéticos, se ha comprobado que el ajuste inducido es un factor determinante en la selectividad de secuencia, demostrando que los polisacáridos con restricciones conformacionales pueden reconocer específicamente secuencias determinadas de ADN.^[51b,56] Así, basándose en la estructura del oligosacárido de la calicheamicina se han sintetizado dímeros covalentes cabeza-cabeza y cabeza-cola del ariltetrasacárido (figura 1.9). Ambos dímeros se asocian con una afinidad 100 veces mayor que la calicheamicina.^[57]

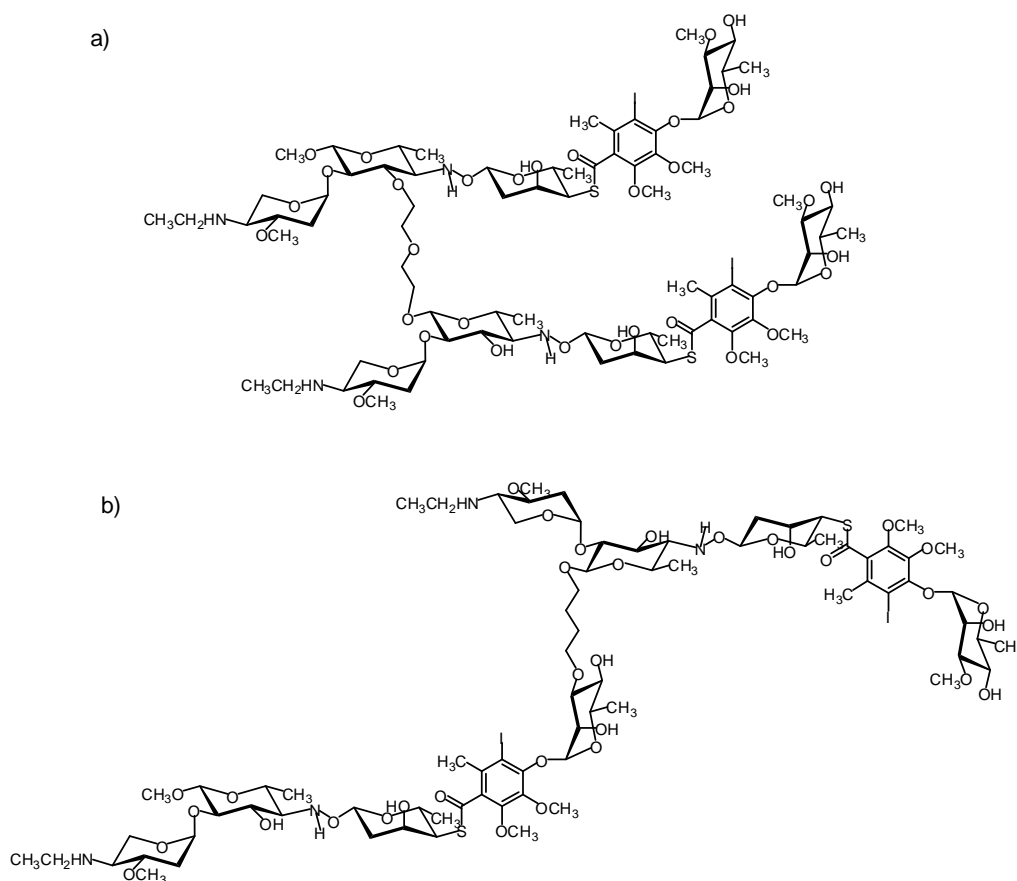


Figura 1.9 a) Dímero cabeza-cabeza y b) Dímero cabeza-cola de la calicheamicina

Estos resultados han abierto un campo de investigación dedicado al estudio de la interacción carbohidrato-ADN con otros antibióticos de naturaleza glicosídica. Así, además de la calicheamicina, existen otros ligandos que contienen carbohidratos y que interaccionan con el surco menor del ADN y son antitumorales como los de la familia de las antraciclinas, ^[49c,58] la daunorrubicina, ^[59] adriamicina (Doxorrubicina) ^[60] y epirubicina ^[61]; los derivados de indolocarbazoles como la rebecamicina ^[62] y los derivados del ácido aureólico como la mitramicina y cromomicina A₃, ^[63] (Figura 1.10).

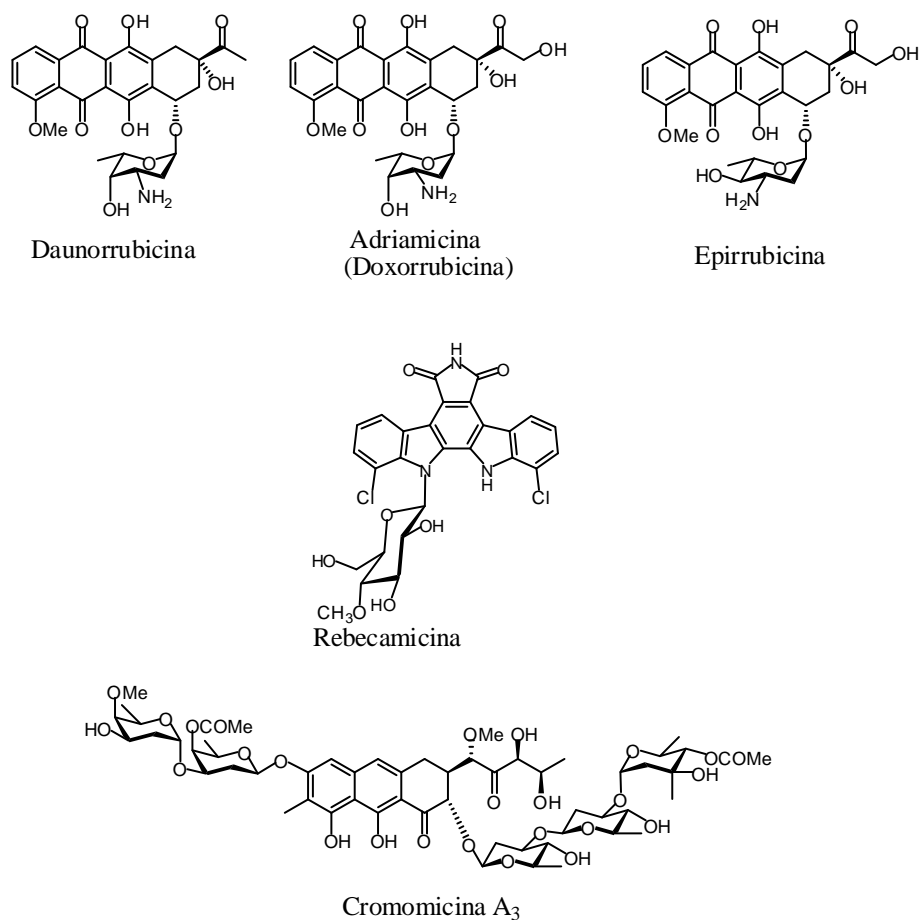


Figura 1.10 Ejemplo de fármacos que contienen carbohidratos en su estructura e interaccionan con el ADN.

En el caso de la Rebecamicina se ha demostrado que sus análogos son mucho más activos que los correspondientes aglicones carentes del residuo sacarídico. Es decir, el azúcar es un elemento clave, tanto para la unión al ADN como para la inhibición de la topoisomerasa I.

Las interacciones no covalentes entre ADN y los ligandos se pueden producir mediante dos modos de unión:^[64] intercalación^[65] entre los pares de bases y mediante la unión a los surcos mayor^[66] o menor^[67] del ADN.

Por otro lado, en el caso de los ligandos neutros, la unión al ADN estará gobernada, principalmente, por interacciones π - π y CH- π con los grupos aromáticos de las bases y, por otro lado, por EHs a través de los grupos aceptores y donadores de EH de las bases púricas y

pirimidínicas así como de los grupos fosfato de las desoxirribosas. De esta manera, los ligandos constituidos por carbohidratos, debido a su topología, serán candidatos idóneos a participar en dichos procesos a través de interacciones de EH y CH- π .

1.2. Interacciones de Enlace de Hidrógeno. Participación en proceso de reconocimiento molecular.

“El enlace de hidrógeno. Un enlace químico electrostático débil que se forma entre un átomo de hidrógeno enlazado covalentemente y un átomo muy electronegativo con un par de electrones no compartido. El EH es de tal importancia en los procesos bioquímicos que la vida sería imposible sin este tipo de enlace”. ^[68]

El reconocimiento de la importancia del EH para la organización estructural de las macromoléculas, se produjo cuando los métodos cristalográficos de Rayos X permitieron la resolución a nivel atómico de la estructura de proteínas y ácidos nucleicos. Basándose en la combinación de datos procedentes de la difracción de Rayos X de fibras y de los resultados de los análisis de las estructuras cristalinas de pequeñas moléculas, Watson y Crick dedujeron la topología de la doble hélice de ADN.^[69] A partir de los resultados del análisis de estructuras cristalinas de amino ácidos, Huggins,^[70] y más tarde Pauling, Corey y Branson,^[71] elucidaron el plegamiento espacial de polipéptidos. Posteriormente, se demostró que el apareamiento de bases propuesto por Watson y Crick es una característica de todas las estructuras helicoidales de los ácidos nucleicos naturales y la base del código genético en los seres vivos. De manera similar, los motivos estabilizados por EH propuestos en la estructura de polipéptidos, la α -hélice y la lámina- β , han sido encontrados como los más recurrentes en la estabilización de la estructura secundaria de proteínas. Recientemente son muchos los ejemplos en bibliografía donde se muestran los EH como protagonistas en procesos de reconocimiento molecular tanto en sistemas sencillos receptor-huésped^[72] como en el reconocimiento de biomoléculas.^[73]

Los EHs^[74] tienen propiedades funcionales que son esenciales para la vida. Son interacciones débiles, comparadas con los enlaces covalentes o iónicos, y pueden, por lo tanto, formarse o romperse con energías que están en el rango de las fluctuaciones térmicas a temperaturas fisiológicas. Esto significa que, procesos que requieren una rápida reacción y reconocimiento intermolecular pueden tener lugar fácilmente. Interacciones más fuertes que los EHs, impedirían seriamente el flujo de la información y de los procesos biológicos. Por otra parte, la debilidad de un EH individual es tal que frecuentemente no es suficiente para proporcionar la fuerza y especificidad necesarias para los procesos biológicos. Esto puede

superarse gracias a que los EHs tienen propiedades vectoriales y son sensibles a la estereoquímica. Los EHs son altamente específicos, con fortalezas aditivas y muy frecuentemente cooperativas, cuando dadores y aceptores de EH se disponen en geometrías particulares. (Ver figura 1.11).



Figura 1.11 El concepto de cooperatividad. Gulliver inmovilizado por una multitud de enlaces débiles.^[75]

La figura tomada de “Los viajes de Gulliver”, ilustra cómo estas fuerzas, sólo un poco más fuertes que las fuerzas de van der Waals, pueden contribuir en la determinación de la forma de las grandes y complicadas moléculas biológicas.

1.2.1. Definición y propiedades de los EHs.

Un EH es una interacción atractiva entre dos especies, cuyo origen está en una unión del tipo $D-H\cdots A$, donde D y A son altamente electronegativos y A posee un par de electrones no compartido. El electrón asociado formalmente al átomo de hidrógeno participa en el enlace covalente $D-H$ y su centro de masas está desplazado con respecto a la posición del átomo de hidrógeno. Esto determina que el átomo de hidrógeno quede desprotegido electrónicamente. De este modo se origina un dipolo con carga positiva en el hidrógeno y carga negativa en el átomo D. El EH es la interacción culómbica del dipolo con exceso de densidad electrónica de los átomos aceptores (Figura 1.12).

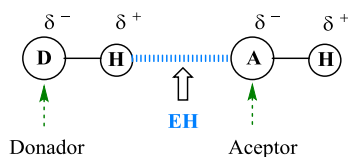


Figura 1.12 Representación de un EH entre un donador de EH (D) y un aceptor de EH (A).

Este punto de vista general acerca de los EHs está apoyado por observaciones experimentales que determinan directamente la distribución electrónica alrededor del átomo de H: Rayos X, estudio de densidad de carga de neutrones, RMN e IR. El EH tiene un cierto carácter direccional, sin embargo, éste es mucho menos pronunciado que el de un enlace covalente, especialmente en el caso de EHs débiles o moderados, donde la interacción es fundamentalmente culómbica.

La fortaleza de los enlaces de hidrógeno va desde moderadamente fuertes como en $\text{P}-\text{OH}\cdots\text{O}=\text{P}$, hasta enlaces muy débiles como en $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$, y las distancias asociadas a $\text{H}\cdots\text{A}$ se encuentran en el rango de 1.5 – 3.0 Å.

Los EHs fuertes son muy diferentes de los EHs moderados o débiles en la mayoría de sus propiedades. Cuando D es un átomo altamente electronegativo y A tiene un excepcional exceso de carga electrónica se forma un EH muy fuerte como por ejemplo en $\text{F}-\text{H}\cdots\text{F}^-$ donde la distinción estructural entre el enlace covalente $\text{F}-\text{H}$ y el EH $\text{H}\cdots\text{F}$ desaparece. También se observan EHs muy fuertes y casi simétricos cuando el grupo dador es un catión o el grupo aceptor es un anión,^[74] como por ejemplo, en $^+\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ y $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}^-$.

Los EHs observados en las estructuras cristalinas raramente son lineales. Incluso cuando hay un único átomo electronegativo aceptor, la probabilidad de observar el átomo de hidrógeno situado exactamente en el centro de $\text{D}\cdots\text{A}$ es muy baja. El valor más probable de ángulo observado para varios ejemplos de EHs está alrededor de 165°, valor consistente con los cálculos *ab initio* de sistemas modelo para enlaces $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$. Esto no implica, sin embargo, que la linealidad no sea la configuración más estable para un EH entre moléculas dadoras yceptoras aisladas o entre dímeros enlazados por EH en fase gaseosa.^[74]

En cuanto a las distancias de EH, el rango para EHs normales o débiles es amplio (entre 1.5 - 3.0 Å) sin embargo a los EHs muy fuertes les corresponde una distancia de EH de entre 1.2 y 1.5 Å.

Hay otra razón por la que un EH puede no ser lineal: la existencia de una fuerza atractiva con un segundo aceptor, como se muestra en la configuración I de la figura 1.9. La configuración I, como EH bifurcado, es bastante común en las estructuras cristalinas de muchas moléculas biológicas pequeñas.^[76] El descriptor EH bifurcado se utilizó también para referirse a una configuración muy diferente: la mostrada en II^[77] (figura 1.9). Debido a su posible importancia en la estructura del agua líquida, esta configuración ha recibido una

considerable atención teórica,^[78] aunque de hecho, es muy raramente observada en el estado cristalino. Hay, sin embargo, algunos ejemplos de esta configuración bifurcada en nucleósidos, pero únicamente, en conjunción con EHs de tres centros (configuraciones III y IV). Más recientemente el término bifurcado ha sido aplicado a la configuración V, propuesta para interacciones entre agua y dimetilfosfato o iones formiato.^[79]

Una inusual configuración bifurcada, VI, ha sido observada también para el 1,3-dimetil uracilo.^[80] (Figura 1.13).

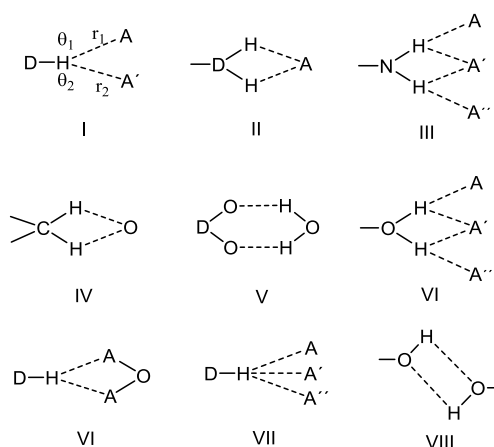


Figura 1.13 Posibles configuraciones de los EHs

El número de oxígenos aceptores procedentes de los grupos hidroxilo y oxígenos de los anillos de azúcares de piranosa excede al número de dadores, sin embargo se han encontrado casos de EHs bifurcados de tres centros.

1.2.2. Factores que modifican la fortaleza de los EHs: Interacciones electrostáticas y cooperatividad.

En cuanto a la fortaleza de un determinado EH, ésta, puede verse modificada dependiendo de su posición con respecto a otros centros dadores o aceptores de EH. Las interacciones culómbicas entre las cargas parciales de los átomos implicados en EHs cercanos, también afectan a la fortaleza de los mismos (interacciones electrostáticas secundarias). Por otro lado, los EHs que forman parte de cadenas o ciclos de EHs, son generalmente más fuertes que EHs aislados (cooperatividad).

- **Interacciones electrostáticas secundarias.**

Un factor que influye en la fortaleza de los EHs son las interacciones secundarias. Estas interacciones son de naturaleza electrostática y tienen su origen en la carga parcial positiva sobre el hidrógeno dador de EH y la carga parcial negativa sobre el átomo aceptor. Las interacciones coulombicas de estas cargas en dos EHs vecinos afectan a la fortaleza global de la asociación. El que las interacciones secundarias contribuyan positiva o negativamente, depende del ordenamiento de dadores y aceptores en el complejo. En complejos con tres EHs en los que los átomos dadores y aceptores están alternados (DAD·ADA) hay cuatro interacciones secundarias repulsivas. Esta situación se describe esquemáticamente en la figura 1.13. En complejos DDA·AAD hay dos interacciones secundarias repulsivas y dos atractivas, mientras que en ordenamientos DDD·AAA hay cuatro interacciones atractivas (ver figura 1.14).

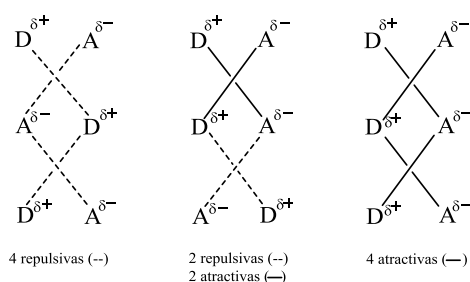


Figura 1.14 Interacciones secundarias en complejos con tres EHs

Estudios teóricos de Jorgensen y colaboradores^[81] han indicado que estas interacciones secundarias pueden explicar el porqué la interacción entre uracilo (U) y diaminopiridina (DAP) es de un orden de magnitud más débil que la de citosina (C) y guanina (G) a pesar de que en ambos se forman tres EHs del mismo tipo (figura 1.15).

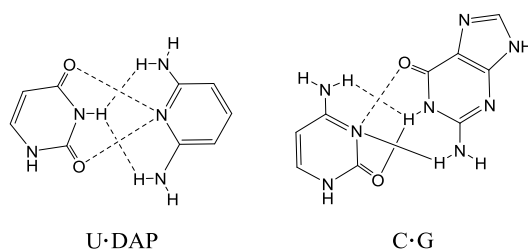


Figura 1.15 Ejemplo de interacciones secundarias

El efecto de las interacciones secundarias fue demostrado por Zimmerman en disolventes apolares, quien investigó sistemáticamente todas las posibilidades descritas en la figura 1.14 y algunas otras combinaciones.^[82]

- **Cooperatividad de EH.**

Una de las características más importantes de los complejos estabilizados por múltiples EHs es la no aditividad de dichas interacciones, lo que ha dado lugar al concepto de cooperatividad. La cooperatividad de EH se define como el fortalecimiento de un primer EH entre un dador y un aceptor, $D-H\cdots A-H$, cuando un segundo EH se forma entre una de estas dos especies y un tercer centro B.^[83] (Ver figura 1.16).

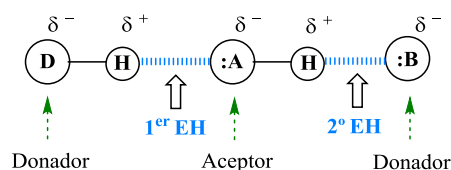


Figura 1.16 Representación de una red de EH cooperativa.

La cooperatividad de EH fue descrita en los 70 mediante cálculos *ab initio* de polímeros de agua.^[84] El primer estudio sistemático de los patrones de EH en las estructuras cristalinas de carbohidratos reveló estos patrones cooperativos^[85] y su efecto sobre las longitudes de enlace medias.^[86] Estudios teóricos posteriores permitieron una estimación de la disminución de las longitudes del EH y la energía ganada debido al efecto cooperativo entre los EHs que estabilizan los trímeros del metanol.^[87]

La cooperatividad es consecuencia de la polarización de los patrones de EH continuos y la energía de una estructura de red de EH es mayor que la de la suma de los EHs individuales: $E(H\cdots B)_n > n(H\cdots B)$.^[74]

Cuando se describen los patrones de EH encontrados en las estructuras cristalinas, es necesario distinguir entre cooperatividad σ y cooperatividad π .^[88] Ambos tipos de cooperatividad son el resultado de una polarización de enlaces. La cooperatividad σ ocurre cuando los grupos implicados en los EHs tienen simultáneamente propiedades dadoras yceptoras de EH. En la práctica, esto ocurre únicamente con los grupos OH, ya que los grupos NH amida nunca son aceptores de EH y los grupos NH₂ (en ácidos nucleicos) raramente lo

son.^[74] La polarización tiene lugar a través de los enlaces σ O—H como se observa en la figura. (figura 1.17).

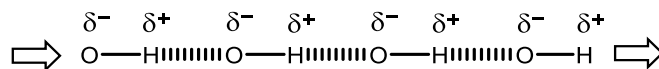


Figura 1.17 Representación de cooperatividad de EH tipo σ

La cooperatividad de tipo π requiere que los grupos funcionales adyacentes a los EHs estén unidos por enlaces con electrones de carácter π . Esto implica la polarización de los electrones de los enlaces covalentes múltiples, como por ejemplo, en los dímeros y polímeros de los ácidos carboxílicos o en los dímeros y polímeros de la formamida. Este tipo de cooperatividad es muy importante en los EHs de la cadena principal de las proteínas donde la cooperatividad aumenta el carácter de doble enlace y, por lo tanto, la rigidez torsional de los enlaces peptídicos C—N. La cooperatividad π también contribuye a la estabilización de los EHs tipo Watson-Crick en los ácidos nucleicos, mediante la deslocalización de electrones (Figura 1.18).

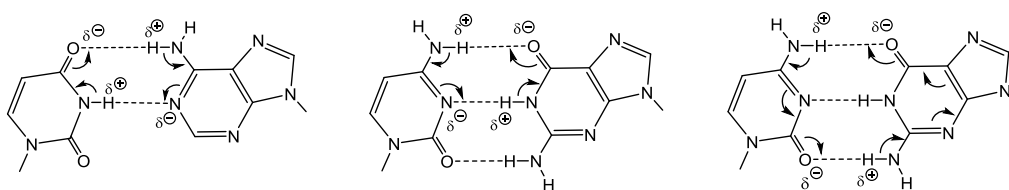


Figura 1.18 Estabilización de los pares de bases A/T, G/C mediante el establecimiento de EHs por cooperatividad tipo π .

La combinación de ambos tipos de cooperatividad de EH se da en casos en los que la formación de EHs implica la polarización de enlaces σ y de enlaces π . Un ejemplo típico de la combinación de ambos tipos de efectos cooperativos es la hidratación de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. La hidratación es un factor dominante en el proceso de plegamiento de péptidos y proteínas, en la estabilidad espacial de sus estructuras y en las interacciones proteína-ligando.

También se ha observado combinación de cooperatividad σ (OHs de los carbohidratos) y π (grupos carboxilato y amídicos de las cadenas laterales de los amino ácidos) en las estructuras cristalinas de los complejos proteína-carbohidrato.^[5]

La espectroscopía vibracional (IR) ha sido la técnica más utilizada para el estudio de efectos cooperativos en disoluciones de alcoholes estabilizados por EH en medio apolar. El primer tratamiento cuantitativo de la cooperatividad de EH fue descrito por Huyskens.^[89] Este autor ha indicado que los desplazamientos de la frecuencia vibracional $\Delta\nu_{D-H}$ son mejores indicadores de la perturbación de la distancia D–H que las constantes de estabilidad de los EHs. Así son muchos los autores que, siguiendo su sugerencia, han utilizado los valores de $\Delta\nu_{D-H}$ para evaluar el fortalecimiento cooperativo de los EHs.^[90]

1.2.3. EHs en carbohidratos.

Los carbohidratos son biomoléculas que pueden encontrarse en la naturaleza como monómeros, oligómeros, cíclicos y polímeros ramificados y lineales. Solos o combinados con purinas y pirimidinas en los ácidos nucleicos, con polipéptidos en las glicoproteínas y con lípidos formando parte de los glicolípidos. Los carbohidratos más simples se parecen a las moléculas de agua en un aspecto importante, su función enlazante de hidrógeno primaria viene de los grupos hidroxilo, los cuales tienen propiedadesceptoras y donadoras al mismo tiempo. Por esta razón sus patrones de enlace de hidrógeno tienen características en común con las del hielo e hidratos. Difieren de los péptidos y proteínas en que la mayoría de los grupos enlazantes de hidrógeno en éstos son grupos NH amido, que son sólo donadores de enlace de hidrógeno, y grupos carbonilo, que son sólo grupos aceptores de EH. Sin embargo, nucleótidos y nucleósidos contienen grupos que son tanto donadores como aceptores y grupos sólo donadores o sólo aceptores, es decir, con características parecidas a las de los carbohidratos y a las de los péptidos.

Los carbohidratos contienen grupos hidroxilo en extensión suficiente y proximidad, como para formar cadenas y ciclos de EHs $OH\cdots OH$ cooperativos. Una de las consecuencias de la formación de cadenas cooperativas de EHs en carbohidratos es la distinta posibilidad de orientación de las cadenas. Se trata de un mecanismo concertado (figura 1.19) en el que se origina un equilibrio de isómeros de EH.

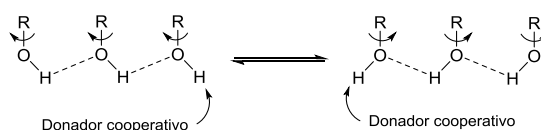


Figura 1.19 Equilibrio conformacional de isómeros de EH

Cuando este fenómeno tiene lugar en largas cadenas cooperativas o en sistemas cíclicos de EH, se describe como un mecanismo flip-flop, ya que tiene lugar de enlace a enlace, como un efecto dominó, e implica únicamente dos estados claramente definidos. En las estructuras biológicas, el desorden conformacional flip-flop tiene lugar en todos los sistemas que presentan grupos hidroxilo implicados en EHs.

Se han encontrado evidencias experimentales acerca de la cooperatividad σ en carbohidratos en el estado sólido que proceden de estructuras cíclicas de alditoles^[86] y ciclodextrinas.^[91] En las estructuras cristalinas de carbohidratos y ciclodextrinas, la ventaja energética del establecimiento de cadenas finitas o infinitas de EH se refleja claramente a nivel estructural mediante el acortamiento de las distancias de EH O–H...H.

Mediante ^1H -RMN en disolución acuosa a baja temperatura, también se encontró cooperatividad entre las moléculas de agua (W) que solvatan un determinado carbohidrato y los OHs del mismo.^[92] Según Harvey y colaboradores, W_β fortalece altamente el EH $\text{R}-\text{OH}\cdots\text{W}_\alpha$ (como se muestra en la figura 1.20.a), de tal manera que, su ausencia determinaría un importante $\Delta\delta$ del OH a campo alto. También proponen que, en disoluciones neutras, el intercambio de los protones hidroxílicos del azúcar con el agua, tiene lugar mediante un proceso de migración concertado a través de estructuras cíclicas cooperativas del tipo de la mostrada en la figura 1.20.b).

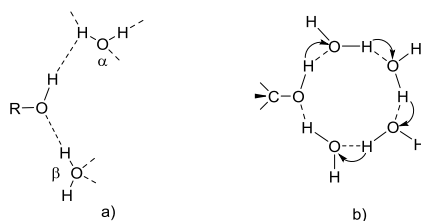


Figura 1.20. Redes de EH cooperativas propuestas por Harvey y colaboradores.

Un detallado estudio de los efectos isotópicos de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) de las resonancias hidroxílicas de glucosa y maltosa, indicó que el EH interresiduo $\text{OH}-3\cdots\text{OH}-2'$ estabiliza cooperativamente la red de EH intramolecular del disacárido maltosa (figura 1.21).^[93]

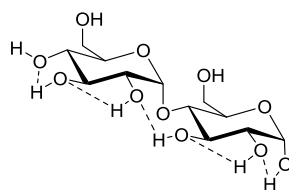


Figura 1.21 Cooperatividad σ intramolecular en maltosa.

Estudios preliminares en nuestro grupo de trabajo, en disolventes apolares, han permitido poner de manifiesto la relevancia de la cooperatividad de EH en los procesos de reconocimiento en los que intervienen los carbohidratos. En dichos estudios se ha determinado que la cooperatividad σ de EHs intramoleculares favorece la formación de EHs intermoleculares en medios apolares. Así, se ha evaluado la estereoquímica relativa de grupos OH que favorecen el ensamblaje de carbohidratos estructuralmente simples por establecimiento de EH intermoleculares cooperativos.^[94] Se diseñaron dioles de carbohidratos con diferentes configuraciones relativas y posiciones de los grupos OH respecto del centro anomérico (2,4 (*ax,ax*) *cis*-diol **1**, 3,4 (*ax, ec*) *cis*-diol **2**, 2,3 (*ec, ax*) *cis*-diol **3** y 3,4 (*ec, ec*) *trans*-diol **4**. (Figura 1.22).

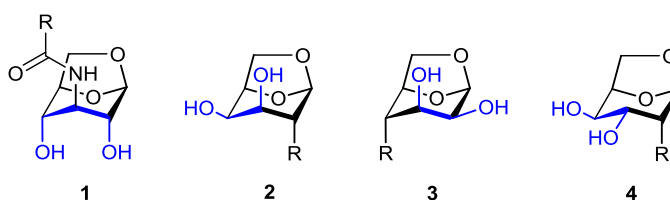


Figura 1.22 Posibles configuraciones relativas de dioles de carbohidratos.

El análisis de desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento, efectos isotópicos y coeficientes de temperatura indicaron la existencia de un EH intramolecular en el derivado **1** confirmando que la dimerización de dicho carbohidrato estaba mediada por un EH entre los grupos OH 2,4-*cis*-diaxial. (Ver Figura 1.25). Así, la configuración del diol **1**, (figura 1.24), fue la única que mostró agregación significativa en cloroformo. De esta manera se demostró que dicha configuración, que forma un EH intramolecular de anillo de 6 miembros, es la más estable y la que conduce a mayores efectos cooperativos en procesos intermoleculares. (Figura 1.23).

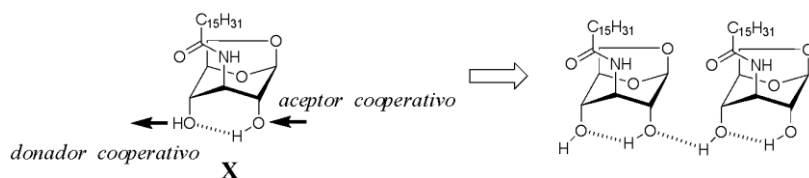


Figura 1.23. Red cooperativa de EH que se establece en el dímero del compuesto X.

Además, la importancia del diseño de carbohidratos con configuración 1,3-cis-diaxial, ha quedado patente con el proceso de reconocimiento molecular de los mismos por el par de bases GC.^[95] Así, la estabilización del complejo entre el amido alcohol y el par de bases GC es el resultado de la formación de EHs intermoleculares cooperativos. (Ver figura 1.24).

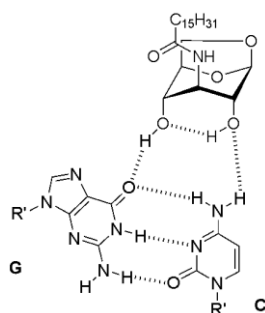


Figura 1.24. Complejo amido alcohol/GC estabilizado por una red de EH cooperativa.

Otro ejemplo de cooperatividad de EH en nuestro grupo, enfocado hacia el conocimiento de la influencia de redes de EH en la interacción carbohidrato-ADN, fue el diseño de motivos de EH de unión eficientes carbohidrato-fosfato en disolventes apolares.^[96] En la figura 1.25 se muestra un motivo de EH entre un amido alcohol 1,2-trans-diaxial cooperativo y un grupo fosfato.

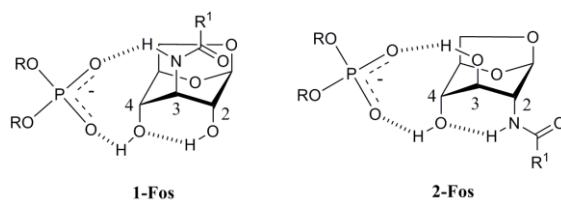


Figura 1.25. Red cooperativa de EH que se establece en los complejos 1-Fos y 2-Fos.

De nuevo, la apropiada disposición de los grupos amido e hidroxilo en carbohidratos proporciona la formación de EHs intramoleculares 1,2-trans-diaxial y 1,3-cis-diaxial de 6 miembros, polarizados en un único sentido, que da lugar a grupos donadores de EH cooperativos potenciales, (NH amido en posición 3 y OH en posición 4), para actuar como eficientes ligandos de fosfato bidentados mediante el uso de la cooperatividad de EH. Así, centros de EH indirectamente involucrados en el proceso de complejación, sirven para generar EH intramoleculares de 6 miembros con centros directamente involucrados en dicha complejación y así favorecer los EHs intermoleculares.

Por último y muy importante para los objetivos de esta memoria, en nuestro laboratorio se diseñaron motivos de EH intramoleculares donde un grupo NH amido, donador de EH, se situó a una distancia tal que pudiera formar un EH intramolecular direccional^a de 5 miembros con un OH particular en un sentido determinado. Así, el NH amido es iniciador de la red de EH siendo OH el aceptor de la amida. Este OH puede actuar a su vez como donador de EH extendiendo la red de EH a un nuevo OH para formar un EH intramolecular adicional de 6 miembros en una única dirección. Esta estrategia dio lugar al aumento del carácter donador de un particular grupo OH como centro donador de EH cooperativo. (Figura 1.26). De esta manera, dicho OH podría participar como centro donador de EH cooperativo en procesos intermoleculares futuros.

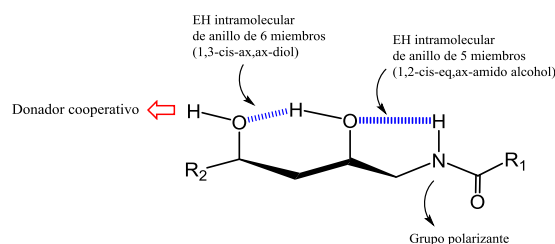


Figura 1.26 Red de EH cooperativa NH...OH...OH

Concretamente, se ha probado la formación de un EH intramolecular de anillo de 5 miembros en el derivado de manosa, (figura 1.27), entre un grupo NH amido de la posición anomérica y el hidroxilo en posición 2 con una configuración relativa 1,2-cis-(*ec,ax*). Este grupo en posición 2 está adicionalmente localizado en una posición 1,3-cis-(*ax,ax*) con un segundo OH en posición 4 del derivado de talosa, (figura 1.27), permitiendo así el

^a Llamamos EH direccional al EH que sólo puede darse en un sentido evitando la existencia de dos posibles isómeros de EH (ver figura 1.19). Así podríamos hablar de EH en un único sentido.

establecimiento de un segundo EH intramolecular de anillo de 6 miembros en una única dirección. De esta forma, OH-2 de manosa y OH-4 de talosa pueden comportarse como centros dadores de EH cooperativos en futuros procesos intermoleculares.^[97]

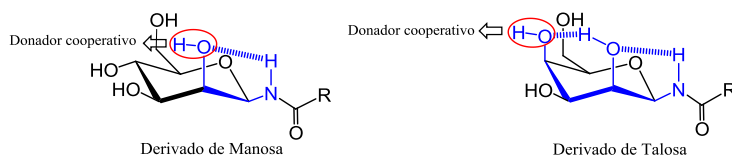


Figura 1.27. EH cooperativos en los derivados de manosa y talosa con OH-2 de manosa y OH-4 de talosa como centros dadores de EH cooperativos.

De esta manera se consiguió el establecimiento de redes de EH intramoleculares dirigidas en un sólo sentido, sin la posibilidad de existencia de isómeros de EH, en derivados de carbohidratos de manosa y talosa en disolventes orgánicos.

A la vista de los resultados en disolventes orgánicos el siguiente reto, en nuestro grupo de investigación, es el desarrollo de una estrategia general para la creación de centros dadores de EH cooperativos mediante la caracterización de redes de EH intramoleculares en medio acuoso.

Esta estrategia, se ha particularizado en glico-oligoamidas, ligandos del ADN, en medio fisiológico. Así, en esta tesis se han sintetizado glico-oligoamidas que contienen carbohidratos con grupos hidroxilo, que están diseñados para actuar como centros dadores de EH cooperativos, siendo candidatos idóneos a participar en procesos de reconocimiento molecular con el ADN.

Inicialmente, lo que se pretende es obtener datos experimentales de la participación de los grupos intercambiables OHs y NHs de dichas glico-oligoamidas en EHs intramoleculares en medio fisiológico.

Aunque existen numerosas técnicas para detectar EHs, (Rayos X, difracción de neutrones, IR, etc), la caracterización de EHs en agua, por RMN, es un área de investigación en activo debido a la dificultad de detección de las resonancias de los grupos intercambiables NHs y OHs.

Se han encontrado en bibliografía ejemplos de caracterización de EHs de NH amido^[98] en proteínas y OHs de carbohidratos^[99] en agua. Haciendo uso de la RMN, Sandström y colaboradores, han caracterizado redes de EH intramoleculares de oligosacáridos^[99d,99g] y ciclodextrinas^[99e] principalmente. En la figura 1.28 se muestran algunos ejemplos.

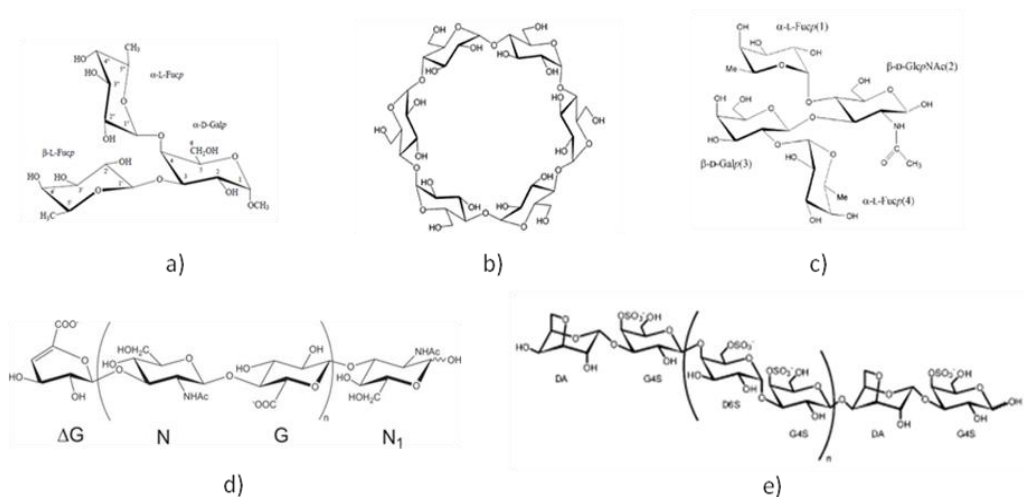


Figura 1.28. Ejemplos de estructuras de oligosacáridos y ciclodextrinas estudiadas por Sándstrom y col. para la caracterización de los EH en disolución acuosa: a) α -D-galactopiranosidos, b) α -ciclodextrinas, c) tetrasacáridos de GlcNAc, d) derivados del hiuloranato, e) derivados de sulfonatos.

1.2.4. EHs en procesos de reconocimiento molecular con el ADN.

Si bien el objetivo a largo plazo del proyecto es probar la cooperatividad de EH en procesos de reconocimiento molecular en general, como se comentó anteriormente, esta tesis es el inicio del estudio de la influencia de EHs cooperativos aplicado, en particular, a procesos de reconocimiento molecular carbohidrato-ADN.

En las últimos dos décadas se ha venido utilizando, con éxito, el empleo de los EHs como estrategia para diseñar ligandos que se asocian al ADN con elevada afinidad y selectividad de secuencia.^[100] Las bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G), contienen en su estructura átomos, potencialmente donadores o aceptores de EH, que se distribuyen a lo largo de los surcos mayor y menor de la doble hélice (Figura 1.29). Estos centros pueden establecer EHs específicos con ligandos de ADN contribuyendo a la selectividad de los mismos por una secuencia determinada.

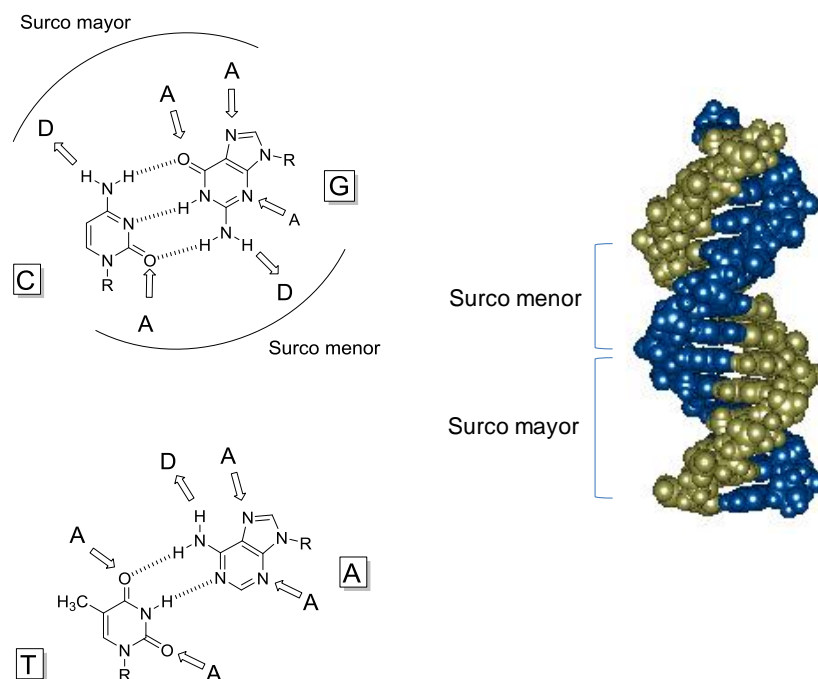


Figura 1.29. Donadores (D) y aceptores (A) de enlace de hidrógeno presentes en los surcos mayor y menor del ADN.

En el surco mayor, los átomos N-7 de guanina y adenina, O-4 de timina y O-6 de guanina son potenciales aceptores mientras que los grupos amino unidos a C-6 de adenina y C-4 de citosina podrían actuar como donadores de EH. En el surco menor, N-3 de adenina y guanina y O-2 de timina y citosina son átomos aceptores de EH, y el grupo amino unido a C-2 de guanina es donador de EH. De este modo, cada surco está definido por motivos de EH característicos de cada uno de los pares de bases. Así, los pares de bases A/T, T/A, C/G y G/C podrían ser identificados de forma clara desde el surco mayor por el patrón y posición de los centros donadores y aceptores de EH (Figura 1.30). En el surco menor, sería posible distinguir entre C/G, G/C y AT/TA, pero no es posible distinguir entre A/T y T/A, ya que contienen el mismo patrón de EH (aceptor/aceptor).

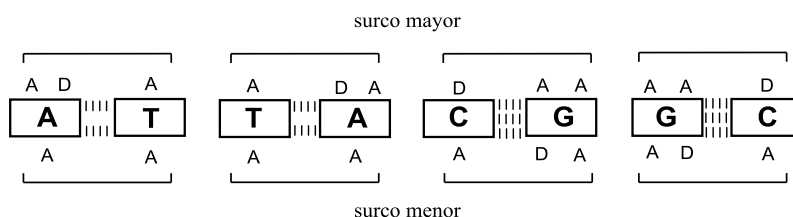


Figura 1.30. Patrón de EH de los pares de bases A/T, T/A, C/G y G/C en los surcos mayor y menor del ADN.

El surco mayor ha sido, durante mucho tiempo, el objetivo de la mayoría de los estudios relacionados con el reconocimiento de secuencias específicas de ADN^[66,101] por su importante papel en los procesos biológicos en que está implicado. Además, el surco mayor posee un mayor número de aceptores y donadores de EH que el surco menor. Neocarzinostatinas, altromicina B o dímeros de neomicina, son algunos de los ejemplos de ligandos estudiados que se asocian al surco mayor del ADN. Sin embargo, desde hace años se conocen compuestos naturales y sintéticos que se unen de manera selectiva a secuencias específicas de ADN, estableciendo EHs específicos con los centros donadores y aceptores de EH del surco menor.^[102] En concreto, la distamicina y la netropsina^[103] son dos antibióticos oligopeptídicos, que contienen unidades de pirrol en su estructura, (figura 1.31), con actividad antiviral y antitumoral. Estos fármacos se asocian eficazmente al surco menor del B-ADN a secuencias ricas en pares de bases de adenina y timina con constantes de afinidad del orden de 10^8 M^{-1} .^[100]

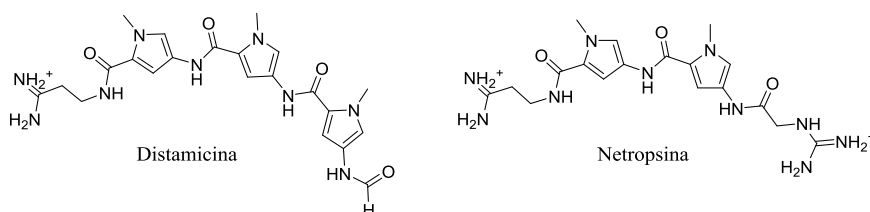


Figura 1.31 Antibióticos distamicina y netropsina (ligandos del surco menor del ADN).

Ambas moléculas poseen una forma arqueada que les permite acomodarse al surco menor del ADN a través del establecimiento de interacciones de van der Waals, electrostáticas y de EH específicos entre los protones amídicos de los ligandos y los centros aceptores de EH presentes en el surco menor.^[104]

Aunque ambos antibióticos se asocian al ADN como monómeros, la distamicina también puede asociarse formando dímeros antiparalelos cuando hay un exceso de ligando. En esta situación, cada uno de los monómeros establece EHs con cada una de las hebras de la doble hélice del ADN.^[105] En la netropsina, la presencia de los dos grupos cargados en los extremos de su estructura impide la formación del dímero en el estado asociado, debido a repulsiones electrostáticas que se generan entre cada monómero.^[103] (Ver figura 1.32).

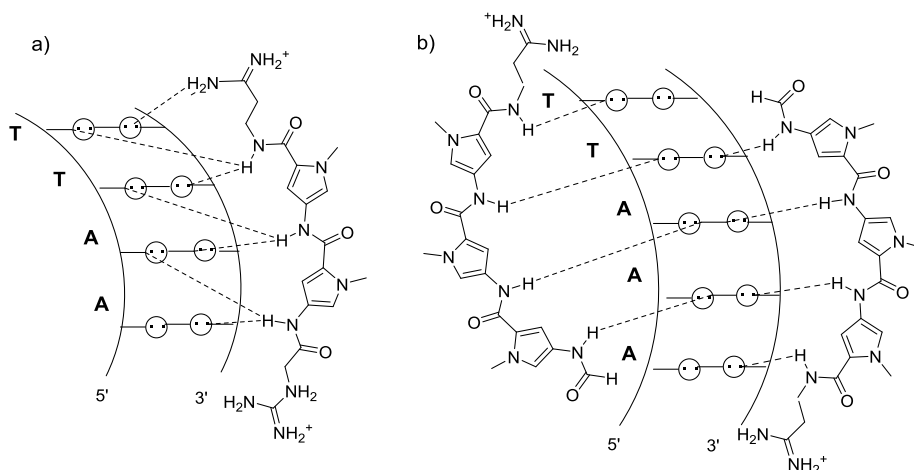


Figura 1.32. Representación esquemática de los complejos netropsina-ADN a) y dímero de distamicina-ADN b).

El reconocimiento de secuencias ricas en AT por parte de la distamicina y netropsina viene determinado por el establecimiento de EHs a través de los protones amídicos (NH) con los centros aceptores de EH presentes en A y T (N-3 en adenina y O-2 en timina) como se muestra en la figura 1.33.^[104]

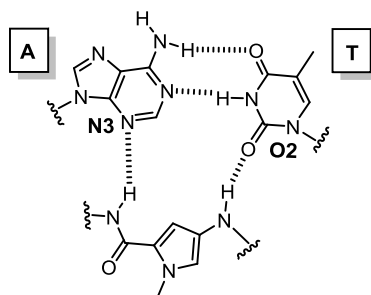


Figura 1.33. Representación esquemática de los EHs que se establecen entre los protones amídicos de netropsina y distamicina y el par de bases AT.

El origen de esta selectividad se debe al impedimento estérico que hay entre el grupo exocíclico de la guanina y el protón 3 del anillo de pirrol perteneciente al antibiótico (ver figura 1.34).

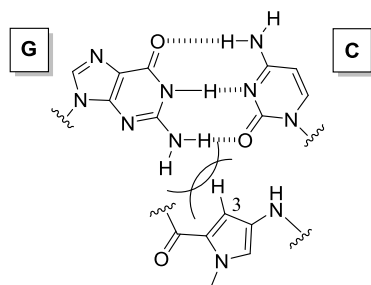


Figura 1.34. Impedimento estérico que tiene lugar entre el grupo amino exocíclico de guanina y H-3 del anillo de pirrol perteneciente a distamicina y netropsina.

El conocimiento a nivel estructural del proceso de interacción de estos antibióticos con ADN ha permitido al profesor Dervan y colaboradores llevar a cabo el diseño racional de poliamidas aromáticas que son eficaces ligandos y selectivos del surco menor del ADN.^[100a,106] La combinación de las unidades de tres amino ácidos derivados del pirrol (py), imidazol (Im) y hidroxipirrol (Hp), permite reconocer los cuatro pares de bases mediante el establecimiento de EHs específicos entre las bases y dichos grupos.^[100,106b,107]

Así, un pirrol reconoce indistintamente adenina y timina porque los centros aceptores de EH de estas bases en el surco menor son topológicamente indistinguibles (figura 1.35).

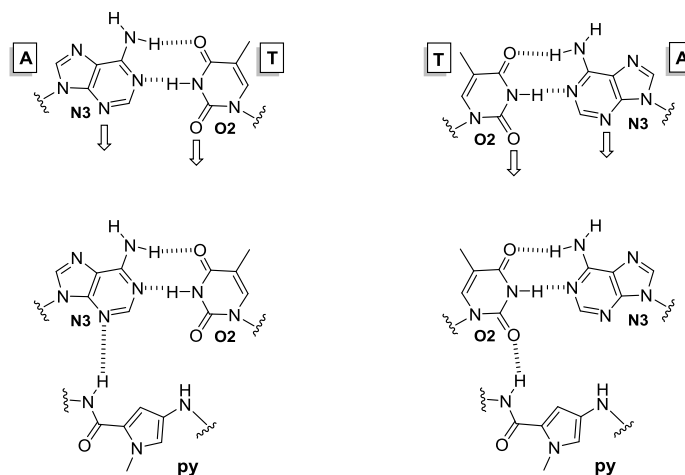


Figura 1.35. Reconocimiento de adenina y timina por parte de una unidad de pirrol.

El anillo de hidroxipirrol reconoce preferentemente timina frente a adenina debido al establecimiento de un EH bifurcado entre el hidroxilo en posición 3 del anillo aromático con O-2 de timina^b (figura 1.36).

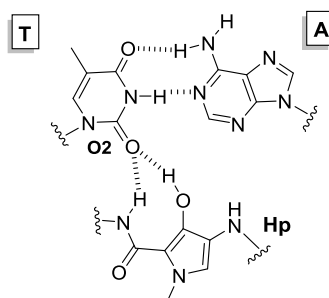


Figura 1.36. Reconocimiento de timina por parte de una unidad de hidroxipirrol.

El imidazol reconoce preferentemente guanina porque posee un nitrógeno en posición 3 que establece un EH con el grupo amino exocíclico de la guanina^c (figura 1.37).

^b La preferencia de T frente a A se basa en la capacidad aceptora del oxígeno para establecer EHs, ya que dispone de dos pares electrónicos sin compartir. El nitrógeno de A, sin embargo, tiene un par electrónico no compartido y sólo puede participar en un EH. ^[107b,108]

^c la sustitución del grupo CH en posición 3 del anillo de pirrol por un nitrógeno en el anillo de imidazol no sólo da lugar al establecimiento de este EH. Además, elimina el impedimento estérico entre H-3 de py y NH-2 de G, razón por la cual el pirrol no reconoce G. ^[109]

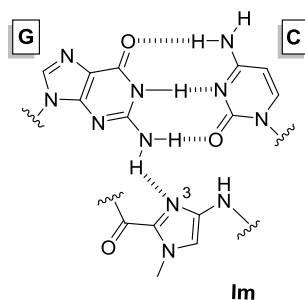


Figura 1.37. Reconocimiento de guanina por parte de una unidad de imidazol.

Estos ligandos forman dímeros en el estado asociado igual que la distamicina y, el reconocimiento selectivo de una secuencia determinada de ADN, depende del par de residuos aromáticos enfrentados en el dímero. Así, un imidazol, frente a un pirrol, reconoce el par de bases G/C, mientras que un pirrol, frente a un imidazol, es selectivo de C/G.^[109] Dos pirroles enfrentados reconocen tanto A/T como T/A.^[110] La discriminación entre estas dos parejas se consigue introduciendo el tercer amino ácido, hidroxipirrol, ya que éste, enfrentado a un pirrol, es selectivo de T/A.^[100b] (Figura 1.38).

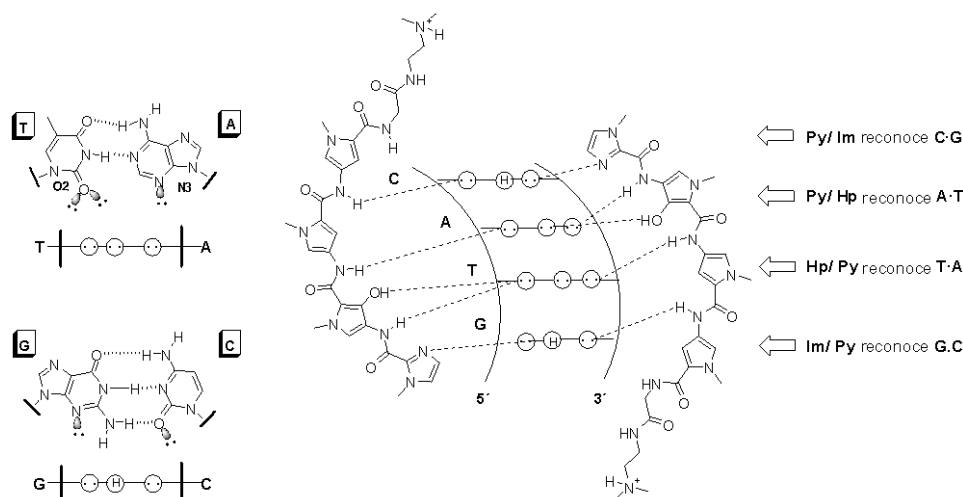


Figura 1.38. Reconocimiento de los cuatro pares de bases (AT, TA, CG, GC) por combinación de los amino ácidos aromáticos (py, Im, Hp) que forman parte de las oligoamidas diseñadas por Dervan. En la figura se muestra la representación esquemática de la oligoamida Im-Hp-py-py asociada a ADN como dímero antiparalelo.

Así, Dervan ha racionalizado el diseño de poliamidas aromáticas generando un auténtico “código de reconocimiento” que permite el diseño de ligandos que se unen

selectivamente a los distintos pares de bases en el ADN^[100,106-107,110-111] mediante el establecimiento de EHs específicos entre las bases y dichos grupos.^[100]

Los esfuerzos llevados a cabo para aumentar la afinidad y la selectividad de estos ligandos han conducido al diseño de moléculas en las que cada una de las oligoamidas que forman el dímero en el estado asociado se han unido covalentemente entre sí.^[112] Con esto, se evita la generación de distintos modos de asociación en función de la disposición relativa que las dos hebras pueden adoptar en el ADN. La observación de la asociación de distamicina como dímero antiparalelo en el surco menor sugirió un diseño en el que las dos hebras de oligoamida se unen a través de una cadena de ácido γ -amino butírico por sus extremos C- y N-terminal. Este ha resultado ser el diseño más eficaz de dímero covalente.^[112b] (Figura 1.39).

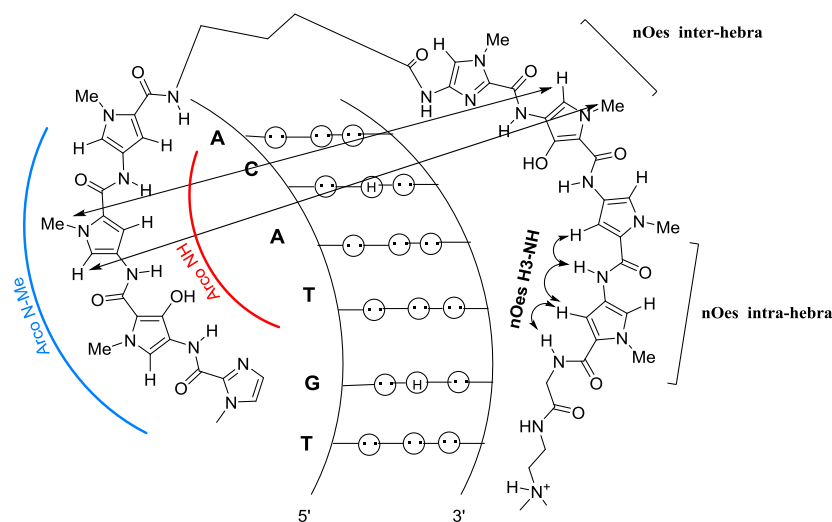


Figura 1.39. Dímero covalente de oligoamida unido a través de una cadena de ácido γ -amino butírico por sus extremos C- y N- terminal. Además se representan los nOes intra- e inter-hebra característicos de la conformación plegada de las oligoamidas en el estado asociado.

Los dímeros covalentes presentan una afinidad y selectividad mayores que el dímero equivalente no covalente que se genera en el estado asociado.^[112b] Wemmer y colaboradores han determinado, mediante estudios de RMN, la conformación que los dímeros covalentes adoptan en el estado asociado.^[113] Se han detectado nOes inter-hebra entre anillos aromáticos enfrentados en la molécula, demostrando que ésta adopta una conformación de horquilla cuando se asocia a ADN. Además, se han encontrado nOes intra-hebra entre las resonancias correspondientes a los protones en posición 3 de los anillos de pirrol y los protones amídicos contiguos a éstos en la misma hebra. Estos nOes han determinado que la horquilla presenta una

conformación arqueada donde se puede definir un arco interior y otro exterior. Así, los protones amídicos se sitúan en el arco interior, (arco NH), mientras que los oxígenos de los grupos amido y los metilos de los anillos aromáticos se sitúan en el arco exterior, (arco N-Me), (figura 1.39).

Estudios recientes sobre el estado asociado al ADN indican que existe la posibilidad de que haya una preferencia en la orientación de los dímeros de poliamida con respecto al sentido 5'-3' o 3'-5' de la hélice de ADN (Ver figura 1.40) dependiendo de la localización de los extremos N y C-terminal de la poliamida en el extremo 5' de una hebra o bien en el 3' de la complementaria.

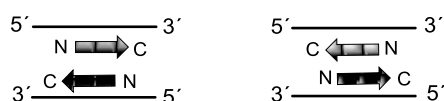


Figura 1.40. Representación, mediante flechas, de las subunidades de poliamida antiparalelas. Las cabezas de flecha corresponden al extremo C-terminal de la poliamida: Izquierda) unión de la poliamida con el extremo N-terminal localizado en el lado 5' de la hebra de ADN. Derecha) unión con el extremo C-terminal de la poliamida localizado en el lado 5' de la hebra de ADN.

En principio un complejo de ADN/poliamida puede formarse uniéndose a dos secuencias de ADN diferentes dependiendo del sentido de plegamiento de la poliamida en las paredes del surco menor del ADN. Sentido N—C en la dirección 5'-3' de la doble hebra o sentido N-C en la dirección 3'-5'. (Ver figura 1.40). Así, en la figura 1.41, se muestra el esquema de la poliamida ImPyPy- γ -PyPyPy que deja el extremo N-Terminal de cada grupo de 3 anillos de poliamida en el lado 5' de la hebra de ADN enlazado en el sentido 5'-TGTTA-3', (debido a que el imidazol reconoce pares de bases G·C por el establecimiento de EHs).^[114] Si por el contrario el extremo N-terminal se coloca en el lado 3', la secuencia a la que se une la poliamida será 5'-TCTTA-3'. Es decir, la especificidad de EH basada en el reconocimiento a través de EHs para una determinada secuencia de ADN establece el sentido de plegamiento de la poliamida. Los estudios de Dervan han demostrado que en sus poliamidas hay una preferencia de plegamiento N- C en el sentido 5'-3' de la doble hélice de ADN,^[115] lo que confirma la relevancia del estudio de la estructura de los ligandos tanto en el estado libre como en el asociado a ADN.

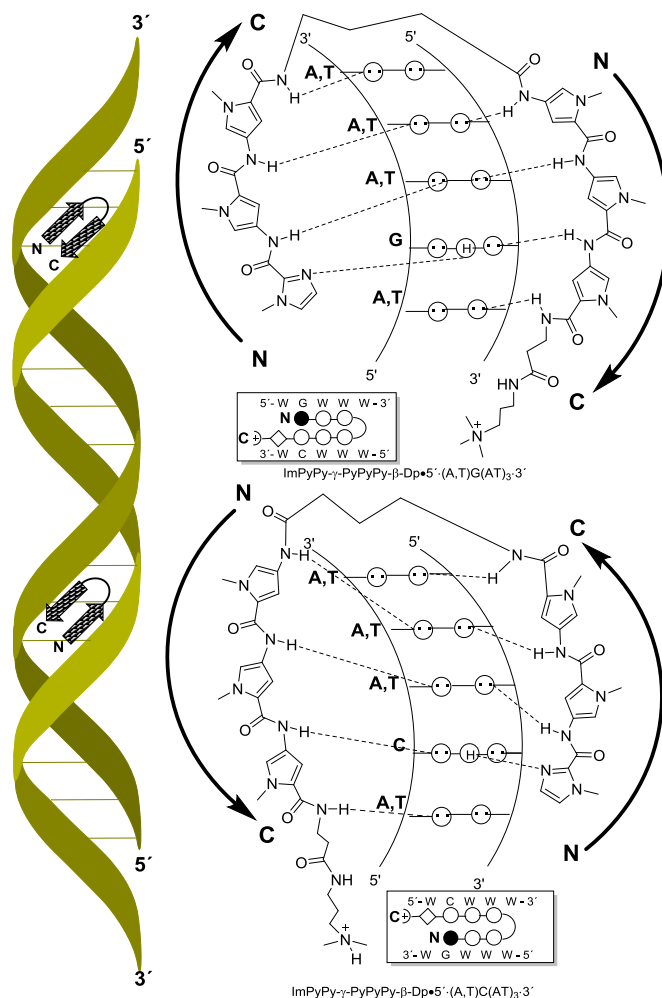


Figura 1.41. Modos de unión a través de EHs para ImPyPy- γ -PyPyPy- β -Dp en los complejos con 5'-WGWWW-3' (arriba) y 5'-WCWWW-3' (abajo), (W = A o T). Los círculos con puntos representan pares solitarios de N3 de las purinas y O2 de las pirimidinas. Los círculos que contienen un H representa al hidrógeno de N2 de guanina. Supuestos EHs están ilustrados por líneas punteadas. Para modelos de unión esquemáticos, los anillos de imidazol y pirrol se representan como esferas con relleno y sin él respectivamente, la línea curva representa al ácido γ -aminobutírico y el residuo de β -alanina es representado como un diamante.

Posteriormente Dervan y colaboradores han estudiado las propiedades de unión al ADN de poliamidas quirales mediante footprinting y “affinity cleavage” demostrando un

aumento de la afinidad y especificidad relativa al ADN sobre las poliamidas no quirales progenitoras.^[115]

El diseño de estas nuevas poliamidas quirales consistió en la sustitución quiral selectiva del hidrógeno α del residuo de ácido γ -aminobutírico de tal forma que en la unión con el ADN el sustituyente NH_3^+ del nuevo centro quiral puede quedar dirigido hacia el interior del surco menor o situarse orientado fuera de él. (Ver figura 1.42).

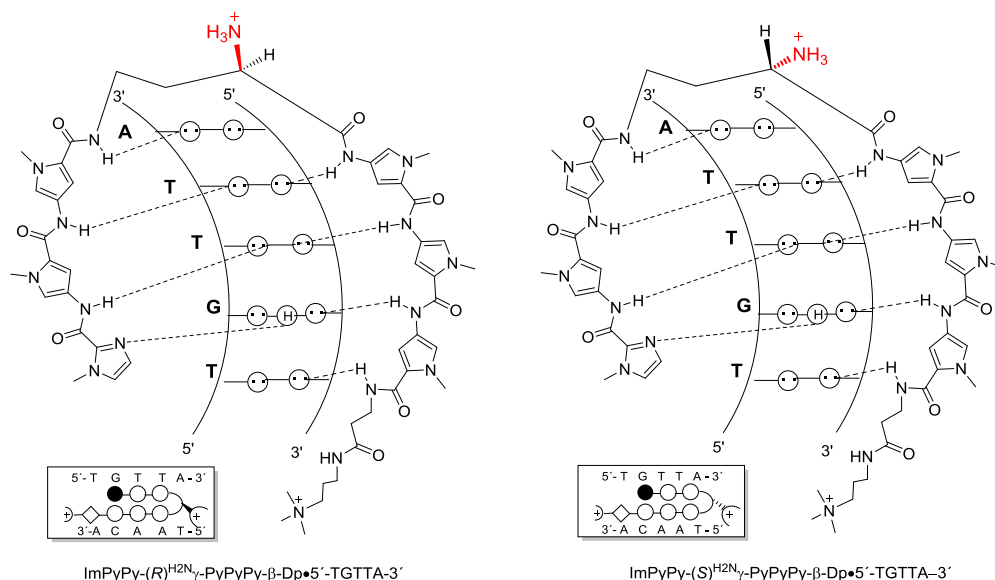


Figura 1.42. Modelo de EH del complejo poliamida/ADN formado entre la poliamida ImPyPy-(R)^{H2N} γ -PyPyPy- β -Dp con 5'-TGTTA-3' (izquierda) y el enantiómero ImPyPy-(S)^{H2N} γ -PyPyPy- β -Dp con 5'-TGTTA-3' (derecha). Los círculos con puntos representan pares solitarios de N3 de las purinas y O2 de las pirimidinas. Los círculos que contienen un H representan al hidrógeno de N2 de guanina. Supuestos EHs están ilustrados por líneas punteadas. Para modelos de unión esquemáticos, los anillos de imidazol y pirrol se representan como esferas con relleno y sin él respectivamente, la línea curva representa al ácido γ -aminobutírico y el residuo de β -alanina es representado como un diamante.

Como puede observarse en la figura 1.42 el enantiómero $R^{\text{H2N}}\gamma$ sitúa al grupo amina del centro quiral fuera de la hélice, sin embargo, en el enantiómero $S^{\text{H2N}}\gamma$ el grupo amino se orienta hacia el interior del surco menor del ADN. (Figura 1.42).

Por lo tanto, en el caso de las poliamidas quirales, la posibilidad de formación de diferentes complejos con la doble hélice del ADN en el surco se complica, existiendo dos plegamientos en horquilla no superponibles para cada enantiómero. Así, un plegamiento será

responsable de una orientación preferida N – C en el sentido 5'–3' mientras que el otro toma la orientación C – N en el sentido 5'–3' de la doble hélice. (Ver figura 1.43).

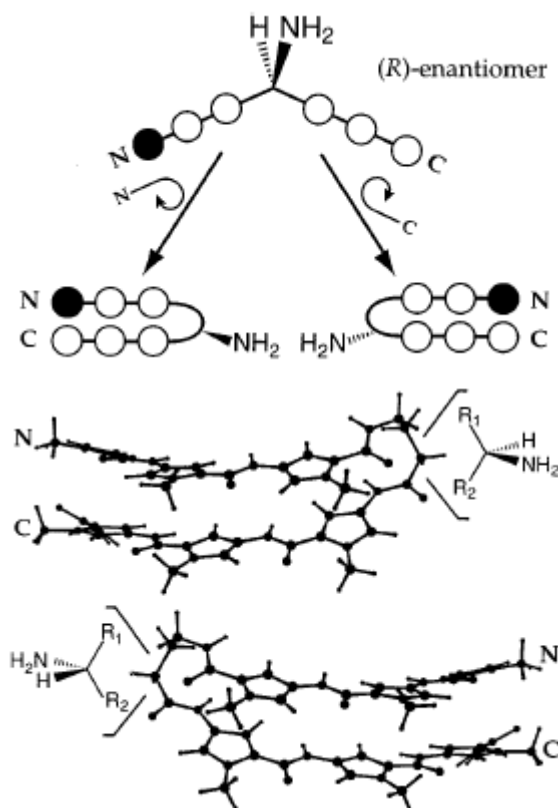


Figura 1.43. Modelo para el plegamiento de poliamidas quirales. Plegamiento N–C (izquierda) y C–N (derecha) en el reconocimiento por ADN en la dirección 5'–3' de la doble hélice.

En el caso de Dervan, para el sentido de plegamiento N–C en la dirección 5'–3', (R)^{H₂N_y} dirige el sustituyente amino fuera del surco menor del ADN, por el contrario, el enantiómero *S* dirige el grupo amino hacia el interior del surco. (Ver figura 1.43). En el caso del plegamiento C–N es el enantiómero *S* el que deja el grupo amino orientado hacia el exterior del surco menor del ADN y el *R* el que lo sitúa hacia el interior.^[116]

En conclusión, y muy importante para los objetivos de esta tesis, la existencia de quiralidad regula la preferencia en cuanto a la orientación de las poliamidas, basada en el diferente plegamiento de dichos ligandos, debido a un reconocimiento específico en el surco menor del ADN.

1.3. Diseño de glico-oligoamidas que contienen carbohidratos con centros dadores de EH cooperativos.

El trabajo que se presenta en esta memoria está enmarcado dentro de un proyecto más general encaminado al estudio de la interacción carbohidrato-ADN. En concreto, el objetivo de esta tesis es la caracterización de redes de EH intramoleculares en carbohidratos en medio acuoso para la generación de centros dadores de EH cooperativos y el estudio de su influencia en procesos de reconocimiento molecular carbohidrato-ADN.

La estrategia que se está explorando en nuestro grupo^[117] para conseguir información estructural, en medio fisiológico, sobre los requerimientos estructurales de la interacción del carbohidrato con el surco menor del ADN, consiste en unir el azúcar a un residuo con características de ligando del surco menor del ADN y una selectividad en la interacción con una determinada secuencia de ADN bien definida. Estudios previos han demostrado que este residuo de oligoamida actúa como vehículo portador^[117] del carbohidrato hasta una secuencia determinada en el surco menor del ADN permitiéndonos conseguir información sobre el papel del carbohidrato en la interacción.^[49f]

Para la selección del vehículo vector nos basamos en las oligoamidas heteroatómicas diseñadas por el profesor Dervan,^[100a,106,118] (figura 1.44).

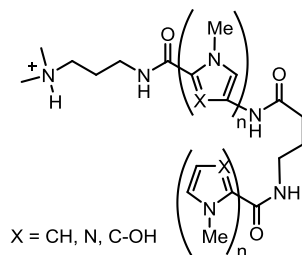


Figura 1.44. Estructura general de las oligoamidas heteroatómicas de Dervan.

En concreto, el fragmento oligoamídico seleccionado está constituido por dos unidades de N-metil-pirrol carboxamida (Py) unidas covalentemente cabeza-cola, mediante un residuo de ácido γ amino butírico (-Py- γ -Py) como fragmento mínimo de oligoamida que podría conservar, no sólo la interacción con el surco menor del B-ADN, sino también la especificidad por el par de bases AT. Con el fragmento de ácido γ aminobutírico uniendo las dos hebras de la glico-oligoamida se pretende que éstas se asocien al surco menor mostrando

una conformación plegada, análoga a la conformación plegada bioactiva de las oligoamidas de Dervan. Así, la unión covalente de un carbohidrato a una oligoamida permitió generar la glico-oligoamida (Figura 1.45). Se optó por incluir el fragmento sacarídico en el extremo C-terminal del vector -Py- γ -Py. (Figura 1.45).

Como novedad, respecto de las oligoamidas de Dervan, se introdujo un anillo de indol en el extremo N-terminal de la oligoamida, opuesto a la posición del carbohidrato. (Figura 1.45).

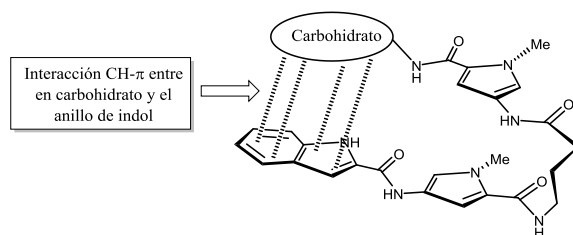


Figura 1.45. Estructura general de la molécula vector unida al carbohidrato. Representación de las interacciones π - π entre las unidades de pirrol e interacciones CH- π entre carbohidrato e indol en la conformación plegada.

El anillo de indol se incorporó por diferentes razones:

1. Como mimético de un anillo de pirrol para mantener la conformación arqueada característica de las oligoamidas.
2. Para aumentar la superficie aromática de la hebra enfrentada al carbohidrato de la glico-oligoamida favoreciendo así la conformación plegada en horquilla bioactiva de estas moléculas por establecimiento de interacciones CH- π carbohidrato-indol^[33b,73a,119] (figura 1.45).
3. Como mimético del triptófano pudiendo participar en interacciones CH- π en procesos de reconocimiento con el surco menor del ADN.

Así, el vector **-Py- γ -Py-Ind** será el fragmento común a todas las glico-oligoamidas sintetizadas. La introducción de uno u otro fragmento sacarídico en el extremo C-terminal de la oligoamida será lo que diferencie unas glico-oligoamidas de otras.

En nuestro caso, conocer la disposición relativa que el carbohidrato adopta respecto del fragmento de oligoamida en el estado libre en disolución acuosa es un elemento clave y de suma importancia en el diseño eficaz de las glico-oligoamidas debido a la existencia de

diferentes tipos de plegamiento, (N–C y C–N), y las diferentes posibilidades conformacionales alrededor del enlace amido-glicosídico que implican diferentes posibilidades de orientación de los centros quirales del carbohidrato.

Así, los centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos de las nuevas glico-oligoamidas, objeto de estudio de esta tesis, podrán dirigirse, por un lado, hacia el interior o el exterior del surco menor del ADN en función de la conformación del enlace amido-glicosídico y, por otro lado, hacia el extremo 5' o bien 3' de la doble hélice según el tipo de plegamiento N–C o C–N que tenga la glico-oligoamida.

Dado que vamos a unir D y L-carbohidratos a la glico-oligoamida y a estudiar la estructura y propiedades de interacción de los enantiómeros con el ADN, es importante definir los lados del carbohidrato que se orientan hacia los arcos exterior (N–Me) e interior (NH) de las glico-oligoamidas. Es importante tener en cuenta, que la conformación más estable de los monosacáridos es, en general, aquella en la que la mayoría de los sustituyentes se disponen en posición ecuatorial.^[120] Así, haciendo referencia a las series D y L, para azúcares de la serie D, la conformación más estable es 4C_1 , mientras que, el conformero 1C_4 se corresponde con el más estable en la serie L. (Figura 1.46).

Por otro lado, el anillo de piranosa confiere a los monosacáridos un carácter tridimensional. Así, el carbohidrato se puede asemejar a un ortoedro formado por seis caras. Una de las caras del ortoedro vendrá definida por el lado del anillo de piranosa constituido por los carbonos C2 y C3 y los centros del lado opuesto C5 y el oxígeno endocíclico O5. (Ver Figura 1.46).

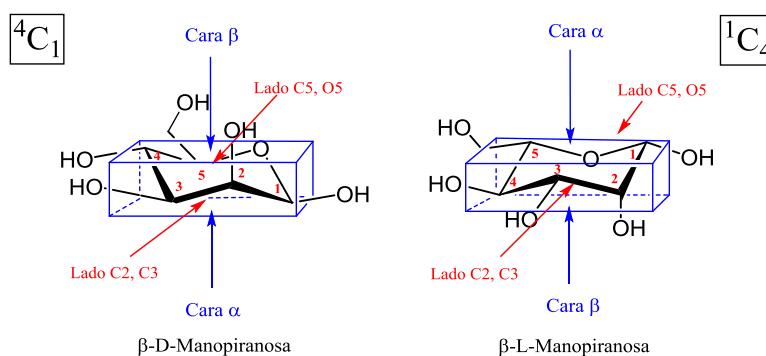


Figura 1.46. Representación de los lados C2, C3 y C5, O5 (en rojo) y las caras α y β (en azul) que se pueden definir en un anillo de piranosa tanto en la serie D (β-D-Manopiranososa) como en la serie L (β-L-Manopiranososa) al encajar un carbohidrato en un ortoedro.

Además, se definen la cara α y β del carbohidrato, perpendiculares a las dos anteriores. Así, en la serie D, la cara α es aquella en la que el heteroátomo exoanomérico está por debajo del plano del anillo y la cara β es aquella en la que éste se sitúa por encima del plano del anillo. Y en la serie L, la cara α es aquella en la que el heteroátomo exoanomérico está por encima del plano del anillo y la cara beta es aquella en la que éste se sitúa por debajo del plano del anillo.

En el caso particular en el que el carbohidrato se une a la oligoamida por la posición anomérica mediante un enlace amido-glicosídico, como es nuestro caso, esta anotación utilizada nos permite definir tanto la cara que se enfrenta al indol, (α o β), como los lados del carbohidrato que se orientan hacia los arcos exterior e interior de la glico-oligoamida (lado C2, C3 y lado C5, O5). (Figura 1.46).

Por lo tanto, la configuración de los centros estereogénicos del anillo de piranosa y la elección de la posición del anillo a través de la cual el carbohidrato se une a la oligoamida es fundamental en el diseño de las glico-oligoamidas, ya que determina la orientación del azúcar respecto del resto de la molécula.

Inicialmente, se llevaron a cabo estudios de modelización de mecánica molecular^[42] de glico-oligoamidas constituidas por monosacáridos de estructura sencilla, para determinar la mejor unión carbohidrato-oligoamida que estabilizaba la estructura en horquilla. Se seleccionó la posición anomérica en configuración ecuatorial del azúcar para unir el residuo sacarídico a la oligoamida ya que permite situar a cualquier monosacárido paralelo al plano del indol independientemente de la naturaleza del mismo.

Así, la estructura general de las glico-oligoamidas se corresponde con la de la figura 1.47 encontrándose el residuo del azúcar y el indol unidos a los extremos C-terminal, por la posición anomérica y en configuración β , y N-terminal del fragmento -Py- γ -Py respectivamente.

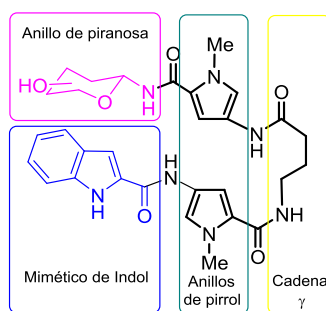


Figura 1.47. Estructura general de las glico-oligoamidas.

En nuestro grupo de investigación se han realizado estudios estructurales por RMN de los complejos formados con glico-oligoamidas, tanto utilizando polímeros de ADN, (experimentos DF-STD y TR-NOESY),^[49f] como con el dodecámero de Dickerson,^[49e] (ver figura 1.49). De estos estudios, se ha concluido que las glico-oligoamidas interaccionan con el ADN con una conformación bien definida, (conformación en horquilla), de tal forma que, el arco interior del ligando, (que contiene los grupos NH), se adentra en el surco menor contactando con las bases mientras, que el arco exterior, (que contiene los grupos N-metilo), se sitúa en la zona externa del surco, próximo a los grupos fosfato del ADN. (Figura 1.48).

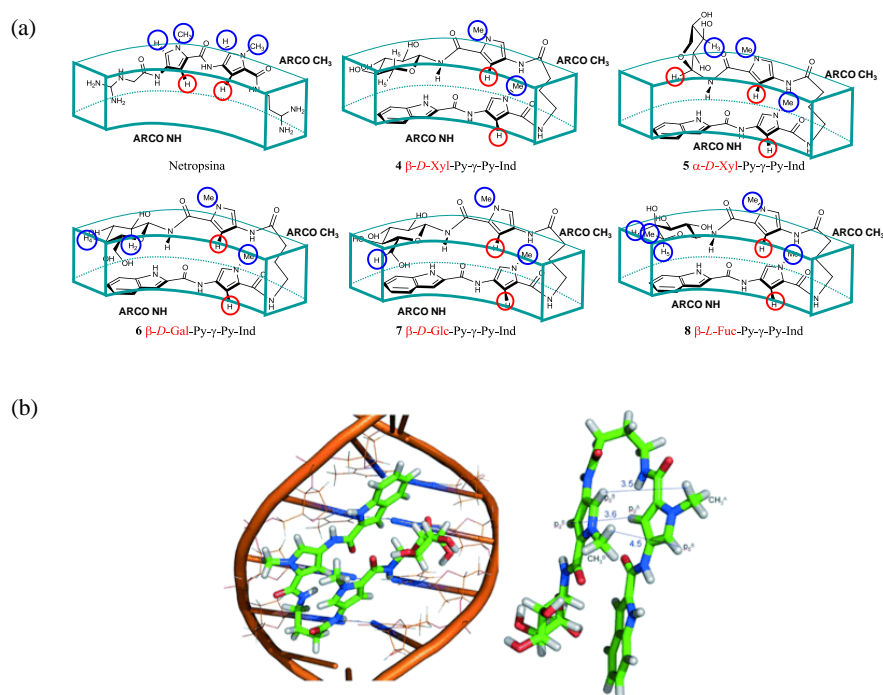


Figura 1.48. (a) Resultados obtenidos de los TR-NOESY y DF-STD para los complejos de netropsina y de las glico-oligoamidas con ct-ADN previamente estudiados en nuestro grupo. ^[49] Aparecen señalados los hidrógenos de las glico-oligoamidas que se observaron, en el complejo, que quedan orientados hacia el interior (azul) y hacia el exterior (rojo) del surco menor del ADN. (b) Izquierda: perspectiva de la región -AATT- de la estructura promedio (después de minimización) del complejo entre β -D-Gal-Py- γ -Py-Ind-d(CGCGAATTCGCG)₂ ^[49e] obtenida mediante tar-MD a partir de los datos de nOe observados. Derecha: estructura promedio de la glico-oligoamida mostrando las distancias (Å) entre pares de protones claves los cuales definen la conformación en horquilla en el estado asociado al ADN.

Los resultados de interacción revelaron que la naturaleza del carbohidrato y su estereoquímica influyen en la interacción con el surco menor del ADN. Por este motivo, el siguiente paso dentro del proyecto que se desarrolla en el grupo ha sido en la estereoquímica del carbohidrato de la glico-oligoamida como veremos a continuación.

El objetivo principal de esta tesis es el establecimiento de redes de EHs intramoleculares para la generación de centros dadores de EHs cooperativos que sean efectivos en agua. Nuestra hipótesis de generación de motivos estructurales de EH en los carbohidratos constituyentes de las glico-oligoamidas es la que se muestra en la figura 1.49.

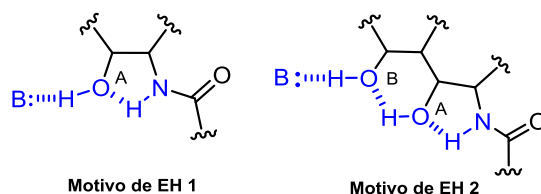


Figura 1.49. Motivos estructurales de EH intramolecular de 5 miembros (Motivo de EH 1, izquierda) y de 5 y 6 miembros, (Motivo de EH 2, derecha), que dan lugar a OH_A y OH_B como centros donadores de EH cooperativos.

Así, la figura 1.49 muestra dos motivos estructurales de EH diferentes. Ambos tienen en común que el NH amídico forma un EH intramolecular de 5 miembros con OH_A que sólo puede establecerse en un sentido, ($\text{NH} \rightarrow \text{OH}_A$). Este enlace dirigido hace que el OH_A se comporte siempre como un donador de EH cooperativo bien en un proceso intermolecular en el motivo de EH 1 o bien de manera intramolecular en el motivo de EH 2. Por lo tanto, el NH amido actúa como un grupo que polariza la red de EH en un solo sentido.

El primer diseño (Figura 1.49, izquierda), muestra un EH intramolecular de anillo de 5 miembros entre el NH amido, (siendo sólo donador de EH), y OH_A . En esta situación OH_A es siempre un aceptor del NH amido, y a la vez, podría comportarse como un donador cooperativo en un proceso intermolecular con un aceptor externo. Esta red de EH puede extenderse a OH_B (Figura 1.49, derecha), si OH_A establece un fuerte y direccional^d EH intramolecular de anillo de 6 miembros.^[97] Así, si ambos EHs direccionales pueden ser establecidos, entonces, OH_B podría comportarse como un donador cooperativo en un proceso intermolecular con un aceptor externo. Así, se espera que OH_B sea un donador de EH más efectivo por cooperatividad.

Este esquema general sirve como estrategia para diseñar centros donadores de EH cooperativos en los carbohidratos de las glico-oligoamidas y así explorar su efecto en la interacción de la glico-oligoamida con el surco menor del ADN.

En concreto, se han diseñado y sintetizado las glico-oligoamidas **β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1)**, **β -D-Man(1)** y **β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2)**, **β -D-Tal (2)**. (Ver figura 1.50).

^d Llamamos EH direccional al EH que sólo puede darse en un sentido evitando la existencia de dos posibles isómeros de EH (ver figura 1.19). Así podríamos hablar de EH en un único sentido

Así, para glico-oligoamidas que unen el carbohidrato al fragmento **-Py- γ -Py-Ind** mediante el NH amídico en configuración β ,^e es necesario que el hidroxilo en posición 2 del anillo de piranosa se encuentre en configuración axial.^f Dicha configuración axial, posibilita la generación de EHs intramoleculares de 5 miembros en **β -D-Man (1)** y de 5 y 6 miembros en **β -D-Tal (2)** como se ha explicado en el esquema general de la figura 1.49. (Ver figura 1.50).

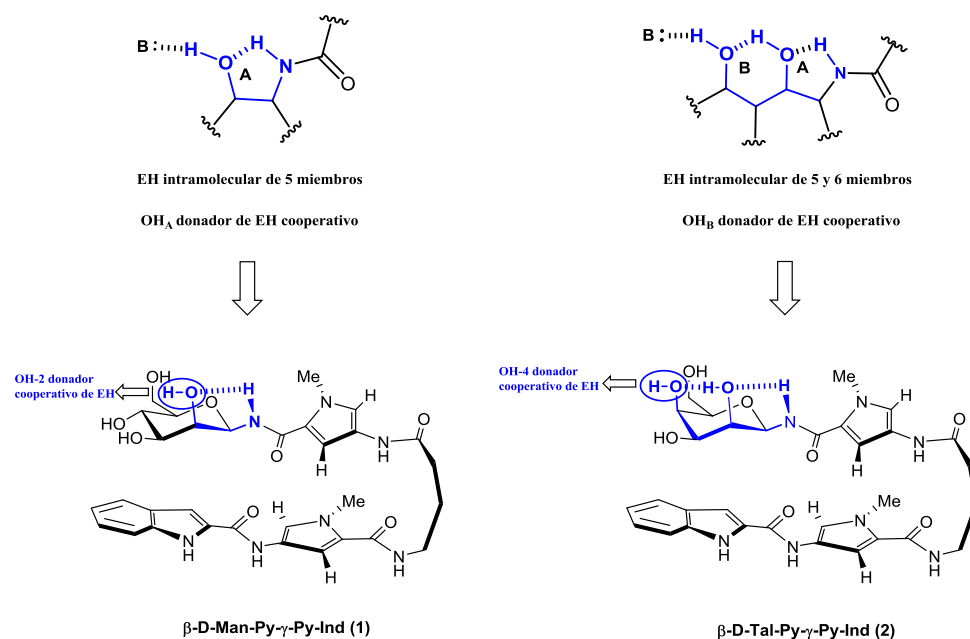


Figura 1.50. Glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** con motivos de EH intramoleculares de anillo de 5 miembros (ec, ax) en el derivado de manosa (izquierda) y de 5 y 6 miembros (ax, ax) en talosa (derecha) generándose OH-2 y OH-4 como centros dadores de EH cooperativos capaces de participar en procesos intermoleculares futuros.

De esta manera, la formación de un EH intramolecular de anillo de 5 miembros es posible en **β -D-Man (1)** debido a la configuración ecuatorial del NH anomérico y axial del hidroxilo en posición 2. Este hidroxilo se comporta siempre como un aceptor de EH del grupo NH amido de la posición anomérica, (que es sólo donador), generándose un EH intramolecular de anillo de 5 miembros (ec, ax) NH-5 \cdots OH-2 en la oligoamida de manosa (**1**) en un único

^e La configuración de la posición anómerica ha de ser β ya que una configuración α del NH amídico no lo deja a distancia de EH de OH-2 impidiendo la formación del EH intramolecular de 5 miembros NH \cdots OH.

^f Todas las glico-oligoamidas estudiadas hasta el momento por el grupo de investigación tienen en posición 2 del carbohidrato el OH orientado en ecuatorial.

sentido. (Figura 1.50, izquierda). Así, OH-2 de **β -D-Man (1)** podría comportarse como un donador de EH cooperativo en un proceso intermolecular con un aceptor externo.

Esta red de EH puede extenderse a OH-4 en **β -D-Tal (2)** si OH-2 establece un EH intramolecular de anillo de 6 miembros (ax, ax) en un único sentido. (Figura 1.50, derecha). Así, el EH en un sentido es factible porque el enlace NH-5 \cdots OH-2 hace que OH-2 se comporte siempre como donador a OH-4. Esto permitirá el establecimiento de ambos EH direccionales en **β -D-Tal (2)** generándose una red de EH intramolecular NH-5 \cdots OH-2 \cdots OH-4, donde OH-4 podría comportarse como un donador cooperativo en un proceso intermolecular futuro.

Para realizar los estudios de caracterización de EH intramoleculares en disolución acuosa por RMN, se han empleado, por motivos comparativos, glico-oligoamidas modelo que incorporan glucosa **β -D-Glc-Py- γ -Py-Ind (3)**, **β -D-Glc (3)**, y galactosa, **β -D-Gal-Py- γ -Py-Ind (4)**, **β -D-Gal (4)** (anteriormente sintetizadas en nuestro grupo, Figura 1.51), con el OH-2 en configuración ecuatorial. Dicha configuración, evita la presencia del motivo de EH más estable de 5 miembros (ec, ax). Así, la falta de este enlace hace que OH-2 en **β -D-Glc (3)** y OH-4 en **β -D-Gal (4)** sean centros dadores de EH no cooperativos.

Por otro lado, para conocer la influencia de la región aromática **-Py-Ind** de las glico-oligoamidas sobre el fragmento de azúcar de los ligandos de ADN, se sintetizaron los modelos de hebra azúcar de las glico-oligoamidas **1 y 2**, **β -D-Man-Py-NHAc (5)** y **β -D-Tal-Py-NHAc (6)** con los mismos centros dadores de EH cooperativos. (Figura 1.51).

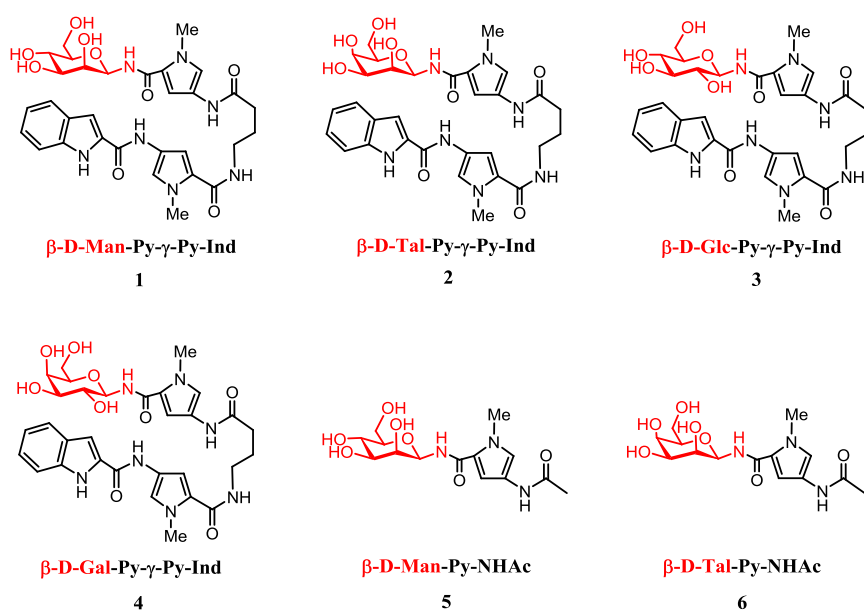


Figura 1.51. Estructuras de las glico-oligomidas con centros dadores de EH cooperativos β -D-Man (1) y β -D-Tal (2), con centros dadores de EH no cooperativos β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4) y de los modelos de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6).

Tanto la caracterización de EHs intramoleculares en β -D-Man (1) y β -D-Tal (2) como los estudios conformacionales en el estado libre en disolución acuosa de las glico-oligoamidas 1-4 y los modelos de hebra azúcar 5 y 6 se tratarán en el capítulo 4 de esta memoria. Los estudios de interacción de las glico-oligoamidas 1-4 con polímeros de ADN se describirán en el capítulo 5 de esta tesis.

Por otro lado, y con el objetivo de dirigir los centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos a una hebra o a su complementaria de la doble hélice del surco menor del ADN, se han sintetizado los enantiómeros de β -D-Man (1) y β -D-Gal (4): β -L-Man-Py- γ -Py-Ind (7), (β -L-Man (7)) y β -L-Gal-Py- γ -Py-Ind (8), (β -L-Gal (8)), respectivamente. (Ver figura 1.52).

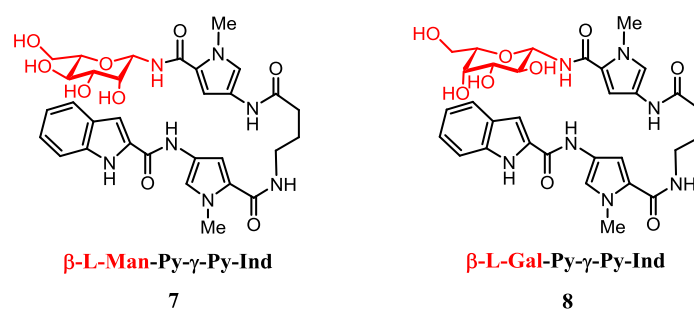


Figura 1.52. Estructuras de las nuevas glico-oligoamidas de la serie L: **β-L-Man (7)** y **β-L-Gal (8)**.

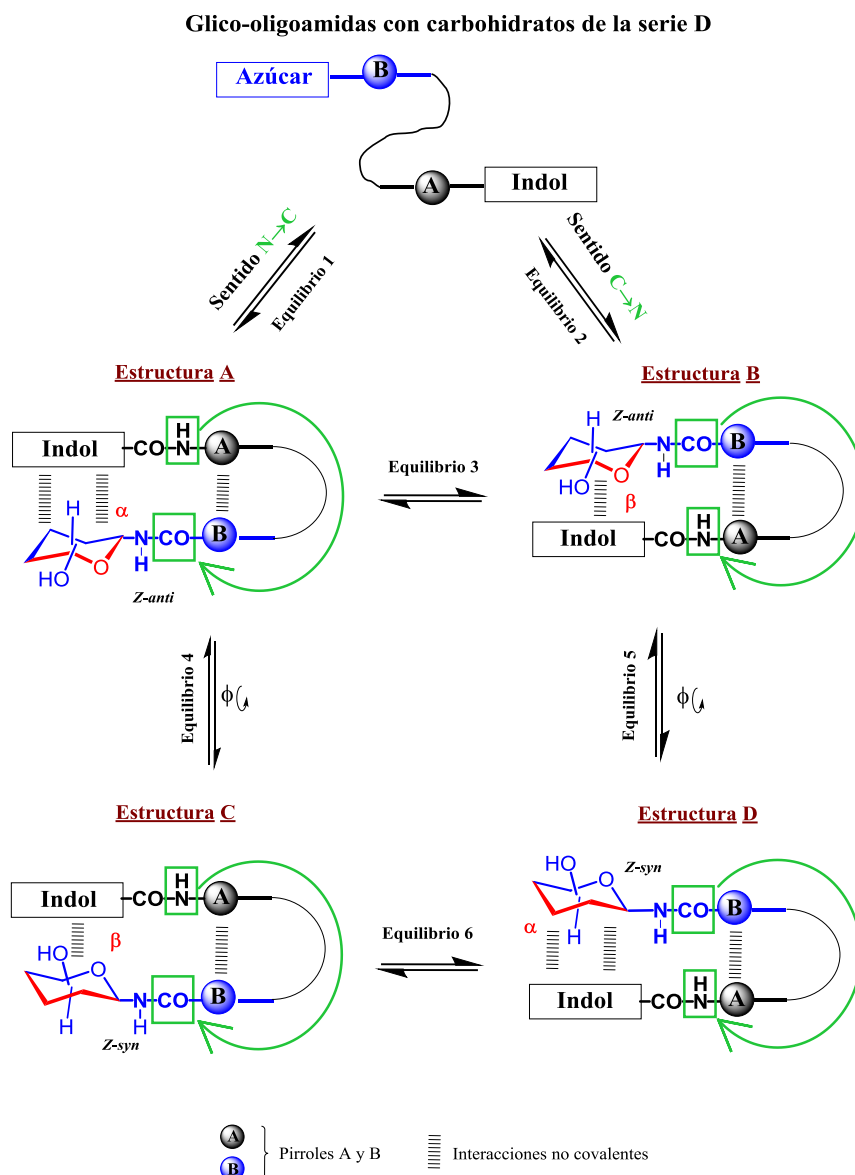
En base a los estudios previos de Dervan para poliamidas quirales,^[116] el diferente plegamiento de la horquilla de los derivados quirales es una característica relevante a la hora de estudiar la interacción de dichos ligandos con el surco menor del ADN. Así, la diferente quiralidad regula la preferencia conformacional en el plegamiento de la horquilla conduciendo a un reconocimiento específico por una secuencia determinada de ADN.

De esta manera, en nuestro caso, los centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos podrían estar involucrados en EHs intermoleculares con centros aceptores de una base, (en el extremo 5'), o bien con los de su complementaria, (en el extremo 3'), si tenemos diferente plegamiento en nuestras glico-oligoamidas enantiómeras.

En nuestro caso para glico-oligoamidas D y L, el esquema general de las posibles conformaciones, (que dependen del plegamiento y de la conformación del enlace amido-glicosídico), en el estado libre se muestra en los esquemas 1.1, (serie D), y 1.2 (serie L).

El esquema 1.1 describe las diferentes conformaciones de plegamiento en horquilla en el estado libre para las glico-oligoamidas de la serie D.

El sentido del plegamiento se definirá siempre mirando a la glico-oligoamida desde el arco N-Me. Así, para el estado libre se hablará de sentido de plegamiento N-C ó C-N en la dirección de las agujas de un reloj.



Esquema 1.1. Equilibrio entre las posibles conformaciones de las glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie D dependiendo del tipo de plegamiento y de la conformación del enlace N-glicosídico.

Partiendo de que todas las glico-oligoamidas hasta ahora estudiadas poseen una conformación promedio mayoritaria plegada en horquilla en disolución acuosa podemos encontrarnos con diferentes situaciones de plegamiento para el caso de ligandos que contienen carbohidratos de la serie D.

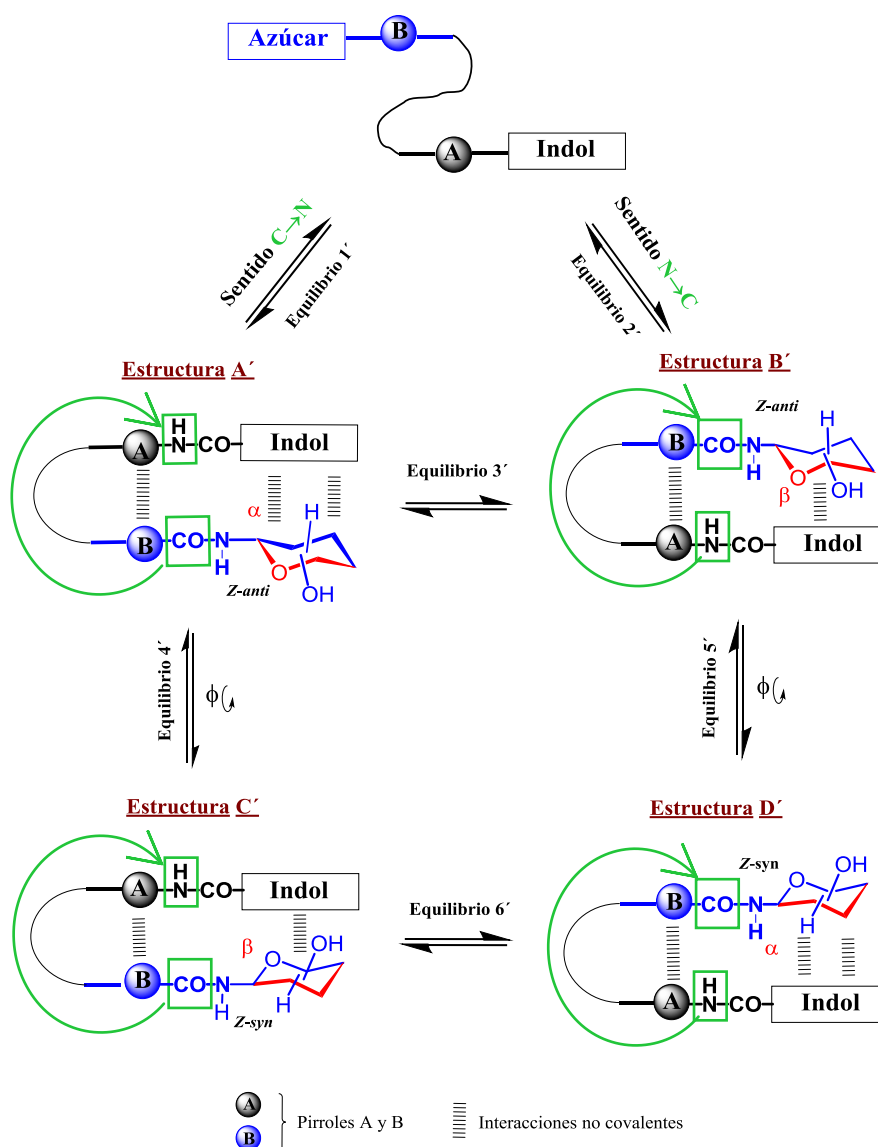
Así, para una **Estructura A** donde el plegamiento se corresponde con un sentido **N→C** nos encontramos que el carbohidrato acerca su cara α al indol, los centros que orienta hacia el arco N-Me de la oligoamida son **O5** y **C5** (en rojo) y la conformación del enlace amido glicosídico es *Z-anti*. Esta estructura se encuentra en equilibrio con la **Estructura B** donde la orientación de los centros **O5** y **C5** así como la conformación *Z-anti* son la misma que en **A**. Sin embargo, cambia el sentido del plegamiento a **C→N** situándose la cara β del carbohidrato cerca del indol, por lo tanto, un cambio en el plegamiento de la horquilla, (de sentido N→C a C→N), implica un cambio en la cara del carbohidrato cercana al indol pero no supone una diferente orientación de los centros del azúcar.

Desde la **Estructura A** y mediante el **Equilibrio 4** podemos pasar a la **Estructura C** generada por un giro alrededor del enlace glicosídico definido por el ángulo diedro ϕ (H1–C1–N5–H5). Así, pasamos desde una conformación *Z-anti* a tener una conformación *Z-syn* para el enlace amido-glicosídico. Este cambio, sin suponer un plegamiento diferente, sí supone una diferente orientación de los centros del carbohidrato, así, esta vez serán C2 y C3 los centros que se orienten hacia el arco N-Me, y será la cara β del carbohidrato la próxima al indol. Finalmente la **Estructura D** se puede obtener directamente de dos formas: bien mediante el **Equilibrio 5** o a través del **Equilibrio 6**. El primer caso implica un giro alrededor del enlace glicosídico desde la **Estructura B**, lo que supone un cambio de la cara cercana al indol y diferente orientación de centros del carbohidrato (cara α hacia el indol y centros C2 y C3 hacia el arco N-Me). El **Equilibrio 6** para la obtención de la **Estructura D** requiere un plegamiento diferente, (desde N→C a C→N) que conlleva una orientación diferente del carbohidrato respecto del indol.

A continuación se muestra el esquema 1.2 donde quedan reflejadas las posibilidades de conformación plegada para glico-oligoamidas que contienen azúcares de la serie L.

Lo más destacado es que si se compara una pareja de enantiómeros, (por ejemplo A frente a A'), cambia el sentido del plegamiento de N→C a C→N, sin cambiar la cara cercana al indol y los centros orientados hacia el arco N-Me.

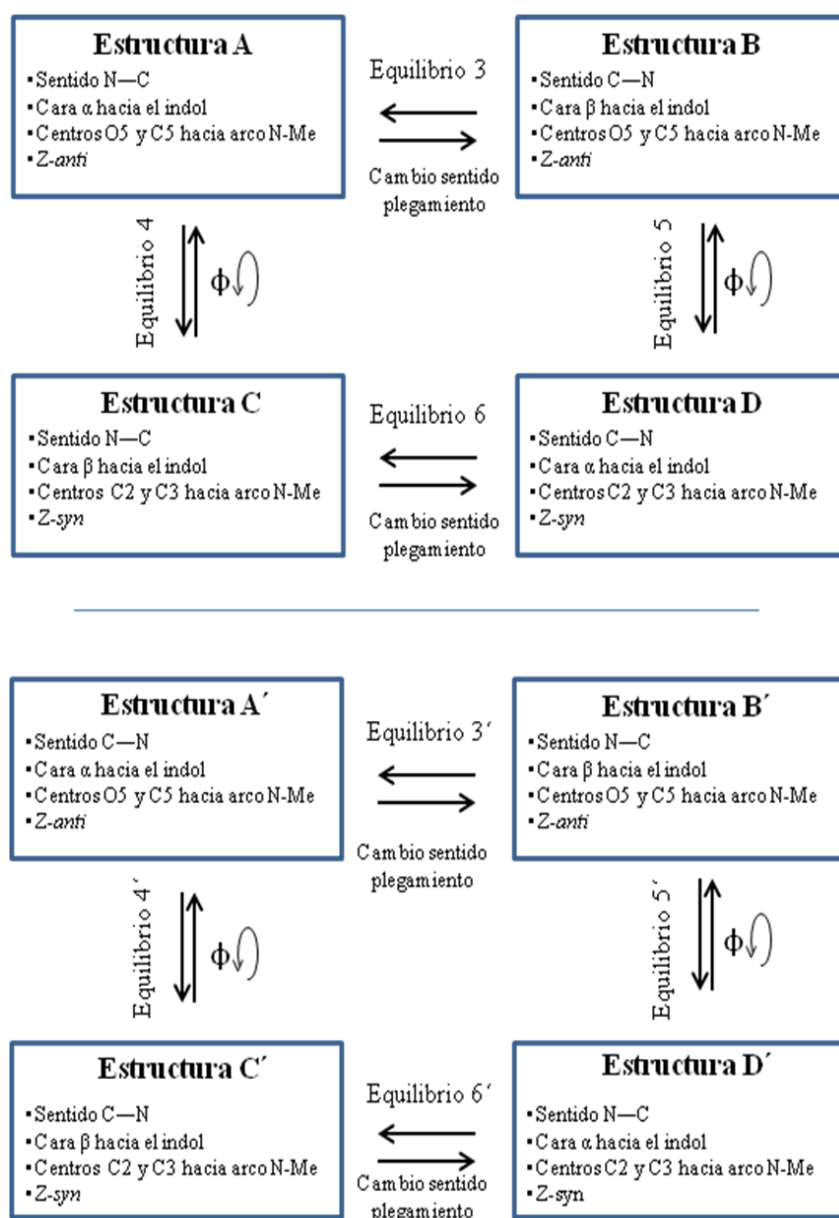
Glico-oligoamidas con carbohidratos de la serie L



Esquema 1.2. Equilibrio entre las posibles conformaciones de las glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie L dependiendo del tipo de plegamiento y de la conformación del enlace glicosídico.

El estudio estructural en disolución de todas las glico-oligoamidas debería permitir escoger la estructura más poblada^g en disolución definida de acuerdo a los datos estructurales que se resumen en el esquema 1.3. Dicho esquema resume las características estructurales de cada conformero, tanto en glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie D, (**A-D**, del esquema 1.1), como en glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie L (**A'-D'**, del esquema 1.2). Dicho esquema recopila los datos estructurales que caracterizan a cada una de las conformaciones y será útil para la discusión de resultados.

^g Hemos de tener en cuenta que en análisis de los datos estructurales de las glico-oligoamidas podemos encontrarnos con mezclas conformacionales.



Esquema 1.3. Resumen de las características estructurales de cada conformación en glico-oligoamidas de la serie D (arriba) y de la serie L (abajo).

Así, para una pareja de enantiómeros en el estado libre, (por ejemplo A vs A'), cuyos centros mantienen la misma orientación hacia el arco N-Me, misma conformación de enlace amido-glicosídico y misma cara cercana al indol, la diferencia estructural radica en un diferente

sentido del plegamiento N–C vs a C–N. Esto es relevante en el estado asociado como veremos a continuación.

De la misma forma que para el estado libre, en el estado enlazado, cada glico-oligoamida enantiómera podrá formar 4 complejos distintos con las 4 conformaciones que se han detallado en el estado libre. A1, B1, C1 y D1. Así, en la figura 1.53 se incluye un ejemplo para **β -D-Man (1)** formando los complejos A1, B1, C1 y D1 y para **β -L-Man (7)** formando los complejos A1', B1', C1' y D1'.

Así, para un mismo enantiómero, un cambio de plegamiento en el estado asociado a una secuencia –ATAT–, (ver A1 vs B1 y C1 vs D1 de la figura 1.53), supone, además de una diferente selección del indol por una de las caras del carbohidrato, el cambio de orientación del centro dador de EH cooperativo C-2 (OH-2) hacia una hebra o bien hacia su complementaria. Así, en A1 OH-2 se dirige hacia el interior del surco menor cercano a una timina de una hebra, mientras que en el caso de B1, ese mismo centro, se dirige hacia el interior del surco menor cercano a una adenina de la hebra complementaria. (Ver figura 1.53).

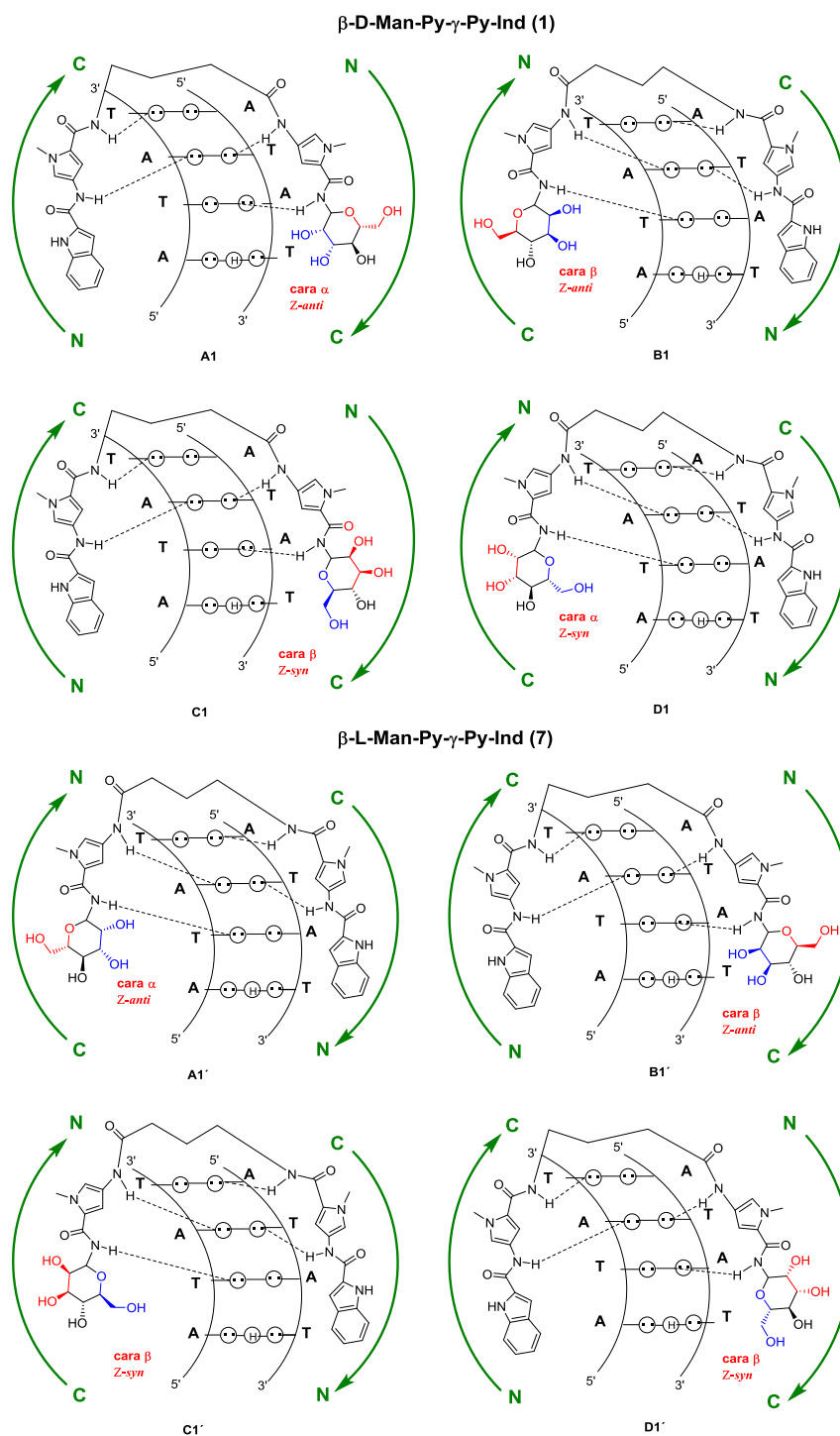


Figura 1.53. Modos de unión de **β -D-Man (1)** (A1-D1) y **β -L-Man (7)** (A1'-D1') en los complejos con 5'-ATAT-3'.

Como conclusión, el empleo de glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie D y de la serie L busca como objetivo la posibilidad de dirigir los centros dadores de EH cooperativos hacia una y otra hebra de la doble hélice a través del reconocimiento específico por una base determinada.

Además, se espera que los diferentes datos experimentales de RMN como constantes de acoplamiento y $nOes$, que proporcionan información a cerca de la conformación del enlace amido-glicosídico y la cara del carbohidrato seleccionada por el indol, faciliten la elección de la estructura más favorable en disolución para cada una de las glico-oligoamidas en el estado libre. (Ver capítulo 4 de la tesis).

Estas distintas conformaciones en el estado libre, (A-D y A'-D'), llevarían a la formación de complejos en el surco menor del ADN, (A1-D1 y A1'-D1'), con diferentes aproximaciones de los centros asimétricos del carbohidrato hacia el interior del surco menor.

1.4. Referencias.

- [1] (a) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130; (b) Dove, A. *Nat Biotech* **2001**, 19, 913-917; (c) Yu, H.; Chen, X. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 865-872; (d) Rademacher, T. W.; Parekh, R. B.; Dwek, R. A. *Annu. Rev. Biochem* **1988**, 57, 785-838; (e) Funakoshi, Y.; Suzuki, T. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2009**, 1790, 81-94; (f) Ghazarian, H.; Idoni, B.; Oppenheimer, S. B. *Acta Histochemica* **2011**, 113, 236-247; (g) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720; (h) Gabius, H.-J. *The sugar code: fundamentals of glycosciences*; Wiley-VCH, 2009.
- [2] Weis, W. I.; Drickamer, K. *Annual Review of Biochemistry*. **1996**, 65, 441-473.
- [3] Rini, J. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 617-621.
- [4] Kollman, P. J. *Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1837.
- [5] Vyas, N. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 732-740.
- [6] Nishio, M. H., M.; Umezawa, y. *The CH/ π Interaction. Evidence, Nature, and Consequences*; Wiley-VCH, 1998.
- [7] (a) Nishio, M.; Hirota, M. *Tetrahedron* **1989**, 45, 7201-7245; (b) Nishio, M. U., Y. *Top. Stereochem.* **2006**, 25, 255.
- [8] Nishio, M. *CrystEngComm* **2004**, 6, 130-158.
- [9] Nishio, M.; Umezawa, Y.; Honda, K.; Tsuboyama, S.; Suezawa, H. *CrystEngComm* **2009**, 11, 1757-1788.
- [10] Nishio, M. *Tetrahedron* **2005**, 61, 6923-6950.
- [11] Nishio, M.; Umezawa, Y.; Hirota, M.; Takeuchi, Y. *Tetrahedron* **1995**, 51, 8665-8701.
- [12] Takahashi, O.; Kohno, Y.; Nishio, M. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 6049-6076.
- [13] Harigai, M.; Kataoka, M.; Imamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10646.
- [14] (a) Chavez, M. I.; Abdrew, C.; Vidal, C.; Aboitiz, N.; Freire, F.; Groves, P.; Asensio, J. L.; Asensio, G.; Muraki, M.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 7060; (b) Vyas, N. K. Q., F. A. *Science* **1988**, 242, 1290-1295.
- [15] Umezawa, Y.; Nishio, M. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 2183.
- [16] (a) Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P. *Science* **2007**, 318, 619; (b) Ferrand, Y.; Klein, E.; Barwell, N. P.; Crump, M. P.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C.; Boons, G.-J.; Ingale, S.; Davis, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1775-1779.
- [17] Schneider, H.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3924-3977.
- [18] Karatsu, M.; Suezawa, H.; Abe, K.; Hirota, M.; Nishio, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, 59, 3529.
- [19] Fernández-Alonso, M. d. C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7379-7386.
- [20] Tsuzuki, S.; Honda, K.; Uchimarui, T.; Mikami, M.; Tanabe, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3746.
- [21] Carrillo, R.; López-Rodríguez, M.; Martín, V. S.; Martín, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 7803.
- [22] (a) Tsuzuki, S.; Fujii, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 2584-2594; (b) Sakaki, S. K., K.; Miyazaki, T.; Musashi, Y.; Ohkubo, K.; Ihara, H.; Hyrayama. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1993**, 89, 659.
- [23] (a) Desiraju, G. R. S., T. *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*; Oxford University Press: Oxford, UK., 1999; (b) Ran, J. W., M.-W. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, 110, 9702; (c) Steiner, T.; Desiraju, G. R. *Chem. Commun.* **1998**, 891.
- [24] Bautista-Ibanez, L.; Ramirez-Gualito, K.; Quiroz-Garcia, B.; Rojas-Aguilar, A.; Cuevas, G. J. *Org. Chem.* **2008**, 73, 849-857.

- [25] (a) Suezawa, H.; Yoshida, T.; Umezawa, Y.; Tsuboyama, S.; Nishio, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 3148; (b) Takahashi, O.; Kohno, Y.; Iwasaki, S.; Saito, K.; Iwaoka, M.; Tomoda, S.; Umezawa, Y.; Tsuboyama, S.; Nishio, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, 74, 2421.
- [26] Takahashi, O.; Kohno, Y.; Ueda, K.; Nishio, M. *New J. Chem.* **2013**, 37, 843-849.
- [27] (a) Soncini, P.; Bonsignore, S.; Dalcaneale, E.; Ugozzoli, F. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4608; (b) Grossel, M. C.; Cheetham, A. K.; Hope, D. A. O.; Weston, S. C. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6654.
- [28] Asensio, J. L.; Ardá, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 946-954.
- [29] Phillips, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1967**, 57, 483.
- [30] Glickson, J. D. P., W. D.; Rupley, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4031-4035.
- [31] Quirocho, F. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 287-315.
- [32] Lemieux, R. U. *Chem. Soc. Rev.* **1989**, 18, 347-374.
- [33] (a) Santana, A. G.; Jiménez-Moreno, E.; Gómez, A. M.; Corzana, F.; González, C.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3347-3350; (b) Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 133-144; (c) Ramirez-Gualito, K. A.-R., R.; Quiroz-García, B.; Rojas-Aguilar, A. D., d.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18129-18138; (d) Kumari, M.; Sunoj, R. B.; Balaji, P. V. *Carbohydr. Res.* **2012**, 361, 133-140.
- [34] Sophie, V.; Dolores, D.; María Carmen, F.-A.; Weidong, P.; Stéphane, P. V.; Gabriel, C.; Francisco Javier, C.; Jesús, J.-B.; Kristin, B. *Chemistry - A European Journal* **2008**, 14, 7570-7578.
- [35] (a) Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7297-7301; (b) Kiehna, S. E. L., Z. R.; Waters, M. L. *Chem. Commun.* **2007**, 4026-4028; (c) Laughrey, Z. R. K., S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14625-14633; (d) Mazik, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 935-956; (e) Roldós, V.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *ChemBioChem* **2011**, 12, 990-1005; (f) Terraneo, G.; Potenza, D.; Canales, A.; Jimenez-Barbero, J.; Baldrige, K. K.; Bernardi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2890-2900.
- [36] Smith, T. J. *Structure* **2008**, 16, 1105.
- [37] Charnock, S. J.; Bolam, D. N.; Nurizzo, D.; Szabó, L.; McKie, V. A.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J. *P. Nat. Acad. Sci.* **2002**, 99, 14077-14082.
- [38] (a) Vacas, T.; Corzana, F.; Jiménez-Oses, G.; González, C.; Gómez, A. M.; Bastida, A.; Revuelta, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12074-12090; (b) François, B.; Russell, R. J. M.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 5677-5690; (c) Rupert, B. F. R., R. J. M.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. *Nucleic. Acids. Res.* **2005**, 33, 5677; (d) Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. *Nature*. **2000**, 407, 340-348; (e) Ennifar, E.; Paillart, J.-C.; Marquet, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Dumas, P.; Walter, P. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 2723-2730; (f) Mikkelsen, N. E. J., K.; Virtanen, A.; Kirsebom, L. A. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 510-514; (g) Tereshko, V.; Skripkin, E.; Patel, D. J. *Chemistry & Biology* **2003**, 10, 175-187; (h) Vicens, Q.; Westhof, E. *Chemistry & Biology* **2002**, 9, 747-755.
- [39] Freisz, S.; Lang, K.; Micura, R.; Dumas, P.; Ennifar, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4110-4113.
- [40] Morales, J. C.; Reina, J. J.; Díaz, I.; Aviñó, A.; Nieto, P. M.; Eritja, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7828-7835.
- [41] Gómez-Pinto, I.; Vengut-Climent, E.; Lucas, R.; Aviñó, A.; Eritja, R.; González, C.; Morales, J. C. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1920-1927.

- [42] Martin, J. N.; Munoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Canada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518-9533.
- [43] (a) Pigman, W. *The carbohydrates: Chemistry and biochemistry*; Academy Press, New York & London, 1970; (b) Moser, H. E. *Carbohydrate in Chemistry and Biology*; Wiley-VCH, 2000.
- [44] (a) Özcan, S.; Andrali, S. S.; Cantrell, J. E. L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2010**, *1799*, 353-364; (b) Slawson, C.; Hart, G. W. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 678-684.
- [45] (a) Akimoto, Y.; Hart, G. W.; Wells, L.; Vosseller, K.; Yamamoto, K.; Munetomo, E.; Ohara-Imaizumi, M.; Nishiwaki, C.; Nagamatsu, S.; Hirano, H.; Kawakami, H. *Glycobiology* **2007**, *17*, 127-140; (b) Gao, Y.; Miyazaki, J.-I.; Hart, G. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *415*, 155-163.
- [46] (a) Jokela, T. A.; Makkonen, K. M.; Oikari, S.; Kärnä, R.; Koli, E.; Hart, G. W.; Tammi, R. H.; Carlberg, C.; Tammi, M. I. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 33632-33640; (b) Hiromura, M.; Choi, C. H.; Sabourin, N. A.; Jones, H.; Bachvarov, D.; Usheva, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14046-14052.
- [47] Guinez, C.; Filhoulaud, G.; Rayah-Benhamed, F.; Marmier, S.; Dubuquoy, C.; Dentin, R.; Moldes, M.; Burnol, A.-F.; Yang, X.; Lefebvre, T.; Girard, J.; Postic, C. *Diabetes* **2011**, *60*, 1399-1413.
- [48] Rexach, J. E.; Clark, P. M.; Mason, D. E.; Neve, R. L.; Peters, E. C.; Hsieh-Wilson, L. C. *Nat Chem Biol* **2012**, *8*, 253-261.
- , C.;
 Morales, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1909-1916; (b) Lucas, R.; Vengut-Climent, E.; Gomez-Pinto, I.; Avino, A.; Eritja, R.; Gonzalez, C.; Morales, J. C. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2991-2993; (c) Shelton, C. J.; Harding, M. M.; Prakash, A. S. *Biochemistry* **1996**, *35*, 7974-7982; (d) Xuereb, H.; Maletic, M.; Gildersleeve, J.; Pelczer, I.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1883-1890; (e) Peñalver, P.; Marcelo, F.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4561-4570; (f) Souard, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, Juan L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435-2442.
- [50] (a) Li, T.; Zeng, Z.; Estevez, V. A.; Baldenius, K. U.; Nicolaou, K. C.; Joyce, G. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3709-3715; (b) Liu, C.; Smith, B. M.; Ajito, K.; Komatsu, H.; Gomez-Paloma, L.; Li, T.; Theodorakis, E. A.; Nicolaou, K. C.; Vogt, P. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 940-944; (c) Walker, S.; Landovitz, R.; Ding, W. D.; Ellestad, G. A.; Kahne, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 4608-4612; (d) Walker, S.; Valentine, K. G.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6428-6429.
- [51] (a) Aiyar, J.; Danishefsky, S. J.; Crothers, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7552-7554; (b) Nicolaou, K. C.; Tsay, S. C.; Suzuki, T.; Joyce, G. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7555-7557.
- [52] (a) Ikemoto, N.; Kumar, R. A.; Ling, T.-T.; Ellestad, G. A.; Danishefsky, S. J.; Patel, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 10506-10510; (b) Kalben, A.; Pal, S.; Andreotti, A. H.; Walker, S.; Gange, D.; Biswas, K.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8403-8412; (c) Kumar, R. A.; Ikemoto, N.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* **1997**, *265*, 187-201; (d) Paloma, L. G.; Smith, J. A.; Chazin, W. J.; Nicolaou, K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3697-3708.
- [53] Ding, W. D.; Ellestad, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6617-6620.
- [54] Uesugi, M.; Sugiura, Y. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4622-4627.
- [55] Krishnamurthy, G.; Brenowitz, M. D.; Ellestad, G. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 1001-1010.
- [56] (a) Bifulco, G.; Galeone, A.; Gomez-Paloma, L.; Nicolaou, K. C.; Chazin, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8817-8824; (b) Bifulco, G.; Galeone, A.; Nicolaou, K. C.; Chazin, W. J.; Gomez-Paloma, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7183-7191.

- [57] Nicolaou, K. C.; Smith, B. M.; Ajito, K.; Komatsu, H.; Gomez-Paloma, L.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2303-2304.
- [58] Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. *Pharmacological Reviews* **2004**, *56*, 185-229.
- [59] (a) Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3933-3940; (b) Chaires, J. B.; Fox, K. R.; Herrera, J. E.; Britt, M.; Waring, M. J. *Biochemistry* **1987**, *26*, 8227-8236; (c) Mukherjee, A. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 3021-3026; (d) Nunn, C. M.; Van Meervelt, L.; Zhang, S.; Moore, M. H.; Kennard, O. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 167-177.
- [60] Farquhar, D.; Cherif, A.; Bakina, E.; Nelson, J. A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 965-972.
- [61] Agrawal, P.; Barthwal, S. K.; Govil, G.; Barthwal, R. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2793-2811.
- [62] (a) Anizon, F.; Moreau, P.; Sancelme, M.; Laine, W.; Bailly, C.; Prudhomme, M. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3709-3722; (b) Prudhomme, M. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *38*, 123-140.
- [63] (a) Banville, D. L.; Keniry, M. A.; Kam, M.; Shafer, R. H. *Biochemistry* **1990**, *29* - , C.; Salas, J. A.; Portugal, J. *Biochemistry* **2010**, *49*, 10543-10552; (c) Gao, X.; Patel, D. J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10940-10956; (d) Hayasaka, T.; Inoue, Y. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2342-2347; (e) Leroy, J. L.; Gao, X.; Gueron, M.; Patel, D. J. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5653-5661; (f) Sastry, M.; Patel, D. J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6588-6604.
- [64] Krugh, T. R. *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, *4*, 351-364.
- [65] Long, E. C.; Barton, J. K. *Accounts of Chemical Research* **1990**, *23*, 271-273.
- [66] (a) Hamilton, P. L.; Arya, D. P. *Natural Product Reports* **2012**, *29*, 134-143; (b) Willis, B.; Arya, D. P. *Current Organic Chemistry* **2006**, *10*, 663-673.
- [67] (a) Baraldi, P. G.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Pavani, M. G.; Romagnoli, R. *Medicinal Research Reviews* **2004**, *24*, 475-528; (b) Bostock-Smith, C. E.; Searle, M. S. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 1619-1624; (c) Cai, X.; Gray Jr, P. J.; Von Hoff, D. D. *Cancer Treatment Reviews* **2009**, *35*, 437-450; (d) Dervan, P. B. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1999**, *217*, 134-ORGN; (e) Doss, R. M.; Marques, M. A.; Foister, S.; Dervan, P. B. *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 886-899; (f) Jain, A. K.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1389-1403; (g) Kahne, D. *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 7-12; (h) Neidle, S. *Natural Product Reports* **2001**, *18*, 291-309; (i) Nelson, S. M.; Ferguson, L. R.; Denny, W. A. *Mutation Research* **2007**, *623*, 24-40; (j) Reddy, B. S. P.; Sondhi, S. M.; Lown, J. W. *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, *84*, 1-111.
- [68] Urarov, E. B. C., D. R. *The Penguin Dictionary of Science*, 1971.
- [69] Watson, J. D. C., F. H. C. *Nature*. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [70] Huggins, M. L. *Chem. Rev* **1943**, *32*, 195.
- [71] Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1951**, *37*, 205-211.
- [72] Cooke, G.; Rotello, V. M. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 275-286.
- [73] (a) Asensio, J. L.; Cañada, F. J.; Siebert, H.-C.; Laynez, J.; Poveda, A.; Nieto, P. M.; Soedjanaamadja, U. M.; Gabius, H.-J.; Jiménez-Barbero, J. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 529-543; (b) Istyastono, E. P.; Nijmeijer, S.; Lim, H. D.; van de Stolpe, A.; Roumen, L.; Kooistra, A. J.; Vischer, H. F.; de Esch, I. J. P.; Leurs, R.; de Graaf, C. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8136-8147; (c) Pan, Y.; Nussinov, R. *Journal of Molecular Recognition* **2010**, *23*, 232-240; (d) Yao, J.; Nellas, R. B.; Glover, M. M.; Shen, T. *Biochemistry* **2011**, *50*, 4097-4104.
- [74] Jeffrey, G. A. *Hydrogen Bonding in Biological Structures* Springer-Verlag, **1991**.
- [75] Swift, J. *Gulliver Reisen*, 1725.

- [76] (a) Albrecht, G.; Corey, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 1087-1103; (b) Jönsson, P. G. K., A. *Acta cRYStallographica. Section B.* **1972**, *28*, 1827; (c) Marsh, R. E. *Acta Crystallographica* **1958**, *11*, 654.
- [77] Pimentel, C. G. *The Hydrogen Bond*; Freeman, 1960.
- [78] (a) Singh, U. C. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 4033; (b) Umeyama, H.; Morokuma, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1316-1332.
- [79] Alagona, G.; Ghio, C.; Kollman, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5226-5230.
- [80] Banerjee, A. *Acta cRYStallographica. Section B.* **1977**, *33*, 90-94.
- [81] Jorgensen, W. L.; Pranata, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2008-2010.
- [82] (a) Murray, T. J.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4010-4011; (b) Zimmerman, S. C.; Murray, T. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4077-4080.
- [83] Frank, H. S. W., W-Y. *Discuss. Faraday Soc.* **1957**, *24*, 133.
- [84] (a) Del Bene, J. P., J. A. J. *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 4858; (b) Hankins, D. M., J.; Stillinger, F. H. J. *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 4544; (c) del Bene, J. P., J. A. J. *J. Chem. Phys.* **1973**, *58*, 3605.
- [85] Jeffrey, G. A.; Gress, M. E.; Takagi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 609-611.
- [86] Jeffrey, G. A.; Lewis, L. *Carbohydr. Res.* **1978**, *60*, 179-182.
- [87] Tse, Y. C.; Newton, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 611-613.
- [88] Bertolasi, V.; Pretto, L.; Gilli, G.; Gilli, P. *Acta Crystallographica Section B* **2006**, *62*, 850-863.
- [89] Huyskens, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2578-2582.
- [90] (a) Kleeberg, H. L., W. A. *J. Chem. Phys.* **1987**, *91*, 3200; (b) Kleeberg, H. L., W. A.; Zeegers-Huyskens, P. *Intermolecular forces. An Introduction to Modern Methods and Results*; Springer-Verlag, 1991; (c) Maes, G.; Smets, J. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 1818-1825; (d) Zeegers-Huyskens, T. *J. Mol. Struct.* **1993**, *297*, 149.
- [91] (a) Notelmeyer, M.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2710-2722; (b) Steiner, T.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7123-7126.
- [92] Harvey, J. M. S., M. C. R. *Nature* **1976**, *261*, 435.
- [93] Christofides *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**.
- [94] (a) Lopez de la Paz, M.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Commun.* **1998**, 465-466; (b) Luque, F. J.; Lopez, J. M.; Lopez de la Paz, M.; Vicent, C.; Orozco, M. *J. Phys. Chem. A.* **1998**, *102*, 6690-6696; (c) López, d. I. P., M.; Ellis, G.; Penadés, S.; Vicent, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1659-1662.
- [95] Lopez de la Paz, M.; González, C.; Vicent, C. *Chem. Commun* **2000**, 411-412.
- [96] Muñoz, E. M.; López de la Paz, M.; Jiménez-Barbero, J.; Ellis, G.; Pérez, M.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1908-1914.
- [97] Vicente, V.; Martin, J.; Jiménez-Barbero, J.; Chiara, J. L.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4240-4251.
- [98] (a) Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z.; Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547-8561; (b) Daley, M. E.; Graether, S. P.; Sykes, B. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13012-13017.
- [99] (a) Bekiroglu, S.; Kenne, L.; Sandström, C. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2465-2468; (b) Hakkarainen, B.; Kenne, L.; Lahmann, M.; Oscarson, S.; Sandström, C. *Magn. Res. Chem.* **2007**, *45*, 1076-1080; (c) Sheng, S. Q.; Vanhalbeek, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215* - , E. M.; Lundqvist, L. C. E.; Jouanneau, D.; Helbert, W.; Sandstrom, C. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3487-3494; (e) Bekiroglu, S.; Kenne, L.; Sandström, C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1671-1678; (f) Bekiroglu, S.; Sandström, C.; Norberg, T.; Kenne, L. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 409-418; (g) Nestor, G.; Kenne, L.; Sandstrom, C. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2795-2802; (h) Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 809-815.

- [100] (a) White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1998**, 391, 468-471; (b) Urbach, A. R.; Szewczyk, J. W.; White, S.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 11621-11629.
- [101] (a) Kumar, S.; Xue, L.; Arya, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7361-7375; (b) Xi, H.; Davis, E.; Ranjan, N.; Xue, L.; Hyde-Volpe, D.; Arya, D. P. *Biochemistry* **2011**, 50, 9088-9113.
- [102] Wemmer, D. E. *Biopolymers* **1999**, 52, 197-211.
- [103] (a) Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1985**, 82, 1376-1380; (b) Patel, D. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1982**, 79, 6424-6428.
- [104] Lavery, R. Z., B.; Pullman J. *Biomol. Struct. Dyn.* **1986**, 3, 1155.
- [105] (a) Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5723-5727; (b) Pelton, J. G. W., D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1393; (c) Shultz, P. G. D., P. B. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1984**, 1, 1133.
- [106] (a) Dervan, P. B. *Biorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215-2235; (b) Dervan, P. B.; Bürli, R. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 688-693.
- [107] (a) Wemmer, D. E.; Dervan, P. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 355-361; (b) Kielkopf, C. L.; White, S.; Jason, W. S.; Turner, J. M.; Eldon, E. B.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *Science* **1998**, 282, 111-115; (c) Bremer, R. E.; Szewczyk, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Biorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1947-1955.
- [108] Kielkopf, C. L.; Bremer, R. E.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 557-567.
- [109] Kopka, M. L.; Goodsell, D. S.; Han, G. W.; Chiu, T. K.; Lown, J. W.; Dickerson, R. E. *Structure (London, England : 1993)* **1997**, 5, 1033-1046.
- [110] White, S. B., E. E.; Dervan, P. B. *Biochemistry*. **1996**, 35, 12532-12537.
- [111] Dervan, P. B.; Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 284-299.
- [112] (a) Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3663-3664; (b) Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983-7988.
- [113] Hawkins, C. A.; de Clairac, R. P.; Dominey, R. N.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5235-5243.
- [114] (a) Wade, W. S.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *Biochemistry* **1993**, 32, 11385-11389; (b) Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2572-2576; (c) Wade, W. S.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8783-8794; (d) Mrksich, M.; Wade, W. S.; Dwyer, T. J.; Geierstanger, B. H.; Wemmer, D. E.; Dervan, P. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89, 7586-7590; (e) Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1996**, 382, 559-561.
- [115] White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8756-8765.
- [116] Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1382-1391.
- [117] Martin, J. N.; Muñoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9518-9533.
- [118] Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6141-6146.
- [119] Jimenez-Barbero, J. A., J.L. ; Cañada, F. J.; Poveda, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 549.
- [120] Robyt, J. F. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*; Ed. Springer, 1998.

2. OBJETIVOS.

El objetivo de esta tesis es el establecimiento de redes de EH intramoleculares para la generación de centros dadores de EHs cooperativos que sean efectivos en agua y el estudio de su influencia en procesos de reconocimiento molecular carbohidrato-ADN.

Para llevar a cabo este objetivo se han diseñado glico-oligoamidas con redes de EH intramoleculares polarizadas en un sentido para la generación de centros dadores de EH cooperativos, (OH-2 en **β -D-Man (1)** y OH-4 en **β -D-Tal (2)**). (ver figura 1.50 capítulo 1).

2.1. Objetivos sintéticos.

2.1.1. Síntesis de glico-oligoamidas que contienen carbohidratos con centros dadores de EH cooperativos: **β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1)** y **β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2)**.

Se van a sintetizar glico-oligoamidas solubles en agua en las que el vector **-Py- γ -Py-Ind** está unido a la posición anomérica del carbohidrato mediante un enlace amido-glicosídico en configuración β : **β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1)** y **β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2)**.

Así, en la glico-oligoamida de manosa (**1**) tendría lugar la formación de un EH intramolecular de 5 miembros (ec, ax) **NH-5...OH-2**. Este enlace polarizado en un único sentido **NH-5→OH-2** permitirá que OH-2 se comporte como un posible centro dador de EH cooperativo. Esta red de EH puede extenderse al OH-4 de la glico-oligoamida de talosa (**2**), mediante el establecimiento de una red constituida por un EH intramolecular de 5 miembros (ec, ax) y de 6 miembros (ax, ax) **NH-5...OH-2...OH-4** pudiendo comportarse **OH-4** como un centro dador de EH cooperativo en futuros procesos intermoleculares. (Ver Figura 2.1 y figura 1.50, apartado 1.3, capítulo 1).

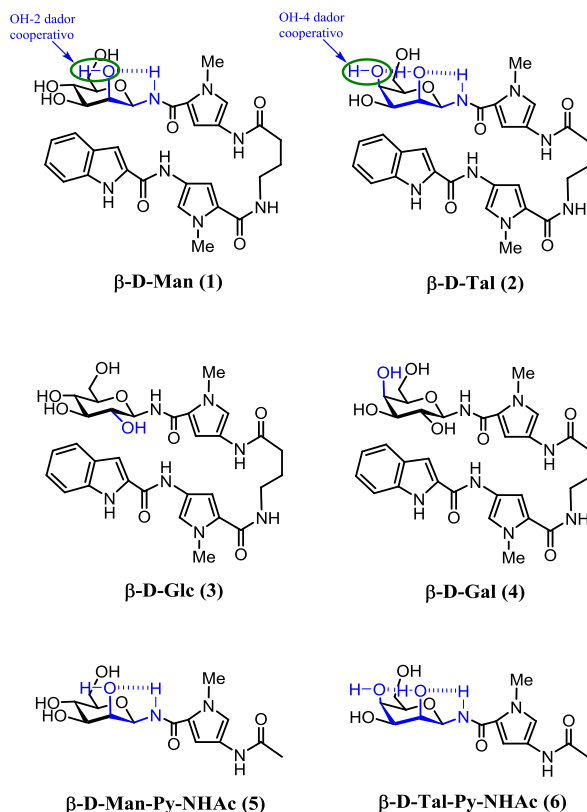


Figura 2.1. Estructura de las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Tal (2) con EH intramoleculares de 5 y 6 miembros respectivamente que generan centros dadores de EH OH-2 y OH-4 cooperativos, glico-oligoamidas modelo β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4) con centros dadores de EH OH-2 y OH-4 no cooperativos y modelos de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6) con posibles centros dadores de EH OH-2 y OH-4 cooperativos.

Por motivos comparativos, se ha llevado a cabo la síntesis de las glico-oligoamidas modelo de glucosa, β -D-Glc (3), y galactosa, β -D-Gal (4) con centros dadores de EH no cooperativos. Así, la configuración ecuatorial del hidroxilo en posición 2 evita la formación del EH intramolecular NH-5...OH-2 (ec, ax) iniciador de la red de EH. (Figura 2.1).

Además, para estudiar la influencia de la hebra indol, tanto a nivel estructural como en los estudios de interacción con el ADN, se propone la síntesis de los compuestos modelo de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6) que también puede presentar en su estructura las redes de EH intramoleculares NH-5...OH-2 y NH-5...OH-2...OH-4 respectivamente. (Figura 2.1).

2.1.2. Síntesis de glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie L con centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos: β -L-Man-Py- γ -Py-Ind (7) y β -L-Gal-Py- γ -Py-Ind (8).

Se sintetizarán las glico-oligoamidas enantiómeras derivadas de β -D-Man (1) y galactosa β -D-Gal (4) con centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos: β -L-Man (7) y β -L-Gal (8). Con ellas se pretende explorar la posibilidad de dirigir los centros de EH cooperativos y no cooperativos hacia una base o a su complementaria de la doble hebra del ADN. (Ver figura 2.2).

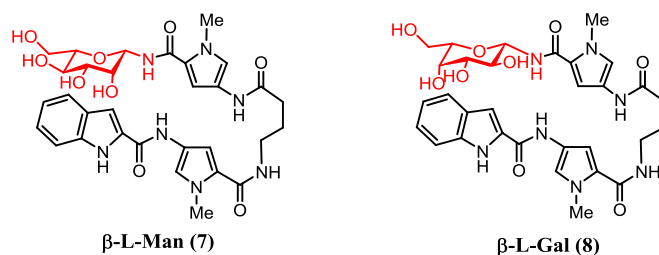


Figura 2.2 Estructura de las glico-oligoamidas β -L-Man (7) y β -L-Gal (8).

Además, se estudiara la glico-oligoamida derivada de 6-desoxy-Manosa para el estudio y comparación de la serie de glico-oligoamidas de manosa: β -D-Man (1), β -L-Man (7) y 6-desoxy- β -D-Man (9). (Figura 2.3).

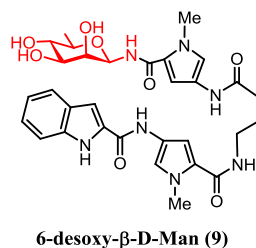


Figura 2.3. Estructura de la glico-oligoamida de 6-desoxy- β -D-Man (9).

2.2. Objetivos estructurales: estudio conformacional de las glico-oligoamidas 1-4 y 7-9 en disolución acuosa por RMN.

El objetivo será determinar el conocimiento de la estructura de las glico-oligoamidas 1-4 y 7-9, objeto de estudio de esta tesis, en el estado libre en disolución acuosa. Se pretende:

- Caracterizar la conformación plegada en horquilla de las glico-oligoamidas mediante estudios de RMN (desplazamientos químicos de ^1H -RMN, constantes de acoplamiento J y nOes).
- Determinar la conformación del enlace amido-glicosídico (mediante constantes de acoplamiento J y nOes).
- Influencia del carbohidrato en la conformación de las glico-oligoamidas.

En base a estos estudios se pretende establecer el sentido del plegamiento $\text{N} \rightarrow \text{C}$ ó $\text{C} \rightarrow \text{N}$ de las glico-oligoamidas y definir los centros tanto del fragmento **-Py- γ -Py-Ind** como del carbohidrato que determinan los arcos NH y N-Metilo (N-Me) de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9**. (Ver esquemas 1.1, 1.2 y 1.3 del capítulo 1).

2.3. Objetivos de caracterización de EHs intramoleculares en glico-oligoamidas **β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1)** y **β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2)** en medio acuoso.

El objetivo de este apartado será la caracterización de redes de EH intramoleculares en medio acuoso por ^1H -RMN que puedan dar lugar a la generación de centros dadores de EH cooperativos en **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**. (Ver figura 2.1).

El protocolo a seguir será la detección de los protones intercambiables OH y NH a baja temperatura y el estudio de parámetros como desplazamientos químico (δ), constantes de acoplamiento (J), coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) y nOes.

2.4. Objetivos de interacción con el ADN.

2.4.1. Estudios de interacción de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** con polímeros de ADN por RMN:

- Determinación del modo de unión al ADN para comprobar si son ligandos del surco menor.
- Determinar la selectividad de secuencia de las glico-oligoamidas mediante estudios de interacción tanto con ct-ADN como con poly(dA-dT)_2 .
- Puesta a punto de un experimento DF-STD de competición para determinar si el fragmento **-Py- γ -Py-Ind** puede usarse como fragmento mínimo necesario para acercar el carbohidrato al surco menor del ADN.

2.4.2. Estudios estructurales de los complejos de las glico-oligoamidas con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT)₂ por RMN.

- Estudio de la conformación de los ligandos en el estado enlazado a ct-ADN y poly(dA-dT)₂ mediante experimentos TR-NOESY. Determinación de la estructura en horquilla de las glico-oligoamidas y la disposición del carbohidrato respecto del indol.
- Determinación de los residuos de la glico-oligoamida más próximos y más alejados del interior del surco menor del ADN mediante experimentos DF-STD:
 - Se pretende definir los residuos del fragmento **-Py-γ-Py-Ind**, así como los centros del carbohidrato, que se encuentran en el arco NH y N-Me de la glico-oligoamida.
 - Conocimiento de la orientación de los centros dadores de EH cooperativos hacia el interior o el exterior del surco menor del ADN.

Con los resultados obtenidos de los experimentos TR-NOESY y STD pretendemos obtener información acerca del sentido de plegamiento C→N ó N→C de las glico-oligoamidas en el surco menor del ADN.

2.4.3. Determinación de un orden relativo de afinidades de las glico-oligoamidas con poly(dA-dT)₂ por ¹H-RMN:

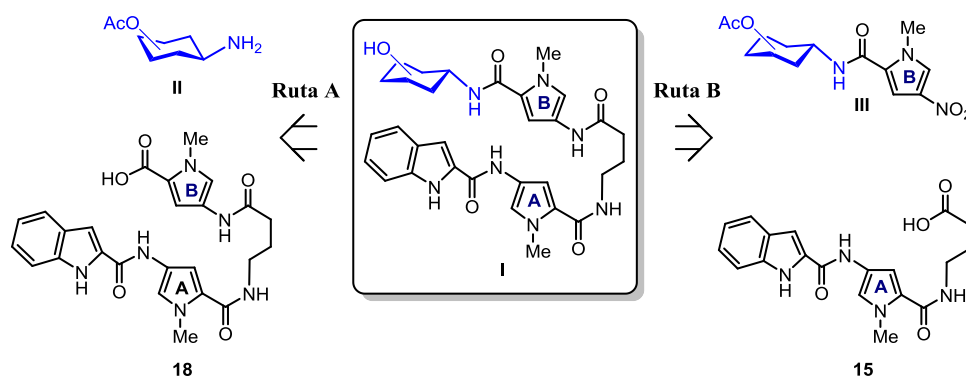
- Estudio de la influencia de las redes de EH intramoleculares en la interacción con poly(dA-dT)₂ entre glico-oligoamidas con centros dadores de EH cooperativos y no cooperativos, **β-D-Man (1)** vs **β-D-Glc (3)** y **β-D-Tal (2)** vs **β-D-Gal (4)**.
- Diferencias de afinidad entre glico-oligoamidas que contienen D y L carbohidratos con centros dadores de EH cooperativos, **β-D-Man (1)** vs **β-L-Man (7)**, y no cooperativos, **β-D-Gal (4)** vs **β-L-Gal (8)**.
- Estudio de la afinidad de la serie de glico-oligoamidas de manosa: **β-D-Man (1)** vs **β-L-Man (7)** vs **6-desoxy-β-D-Man (9)**.
- Validación del método de determinación de afinidades mediante el uso de experimentos de competición entre parejas de glico-oligoamidas por valoraciones de ¹H-RMN.

3. SÍNTESIS DE LAS GLICO-OLIGOAMIDAS β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2), β -L-Man-Py- γ -Py-Ind (7), β -L-Gal-Py- γ -Py-Ind (8), Y EL MODELO DE HEBRA AZÚCAR β -D-Tal-Py-NHAc (6).

3.1. Introducción.

El objetivo de este capítulo es la síntesis de nuevas glico-oligoamidas **I** que contienen azúcares *raros* con centros dadores de EH cooperativos β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2), β -L-Man-Py- γ -Py-Ind (7), y no cooperativos β -L-Gal-Py- γ -Py-Ind (8), así como el modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py-NHAc (6).

Para llevar a cabo este objetivo se ha empleado una metodología puesta a punto anteriormente en nuestro grupo de investigación.^[1] Dicha metodología consistió en el desarrollo de dos rutas sintéticas alternativas (Ruta A y Ruta B) para la obtención de glico-oligoamidas **I** de fórmula general Azúcar-Py^B- γ -Py^A-Ind y que han sido objeto de investigación como ligandos del ADN en nuestro grupo. (Figura 3.1).



Esquema 3.1. Esquema retrosintético para la síntesis de glico-oligoamidas **I** por las Rutas A y B

La Ruta A se estimó como la más adecuada cuando se requiere sintetizar una familia de glico-oligoamidas **I** Azúcar-Py^B- γ -Py^A-Ind con diversidad en el carbohidrato. Esta Ruta ofrece la posibilidad de preparar el ácido oligoamídico HO-Py^B- γ -Py^A-Ind (18) a gran escala. Así, la reacción de este ácido con diversos amino azúcares (Azúcar-NH₂ (II)) ha permitido obtener una amplia variedad de compuestos.

Por estos motivos, en esta tesis, se eligió inicialmente la Ruta A para la síntesis de las nuevas glico-oligoamidas β -D-Tal (2), β -L-Man (7) y β -L-Gal (8). Sin embargo, nos hemos encontrado dificultades durante la síntesis por la Ruta A de las glico-oligoamidas que

contienen carbohidratos cuyo hidroxilo en C2 se encuentra en configuración axial. Afortunadamente dichos problemas se solventaron con el empleo de la Ruta B como ruta alternativa para la síntesis de las nuevas glico-oligoamidas **2**, **7** y **8** como veremos a lo largo de este capítulo.

Además, también hemos empleado la Ruta B para la obtención del modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py-NHAc (**6**) como compuesto modelo de conformación no plegada para comparar con la estructura en horquilla que presentan las glico-oligoamidas **I**.

3.1.1. Azúcares raros.

Derivados de D-Talosa

Se define “azúcar raro” como la clase de monosacáridos y derivados que existen en la naturaleza en pequeña cantidad.^[2] En los últimos años ha crecido el interés por conocer el papel que juegan los azúcares raros como inhibidores potenciales de glicosidasas,^[3] e inmunosupresores,^[4] entre otros.^[5] Además, muchos resultados han demostrado que la estructura de los azúcares raros proporciona una importante función en productos naturales con aplicaciones terapéuticas como daunorubicina,^[6] rebecamicina,^[7] antraciclina,^[8] y tallisomicina.^[9] (Ver figura 3.1).

La talosa y derivados existen en determinadas plantas y bacterias y presentan importantes actividades biológicas y farmacológicas, entre otras,^[10] incluyendo antitumoral,^[11] (ver figura 3.1), y antimicrobiana.^[12]

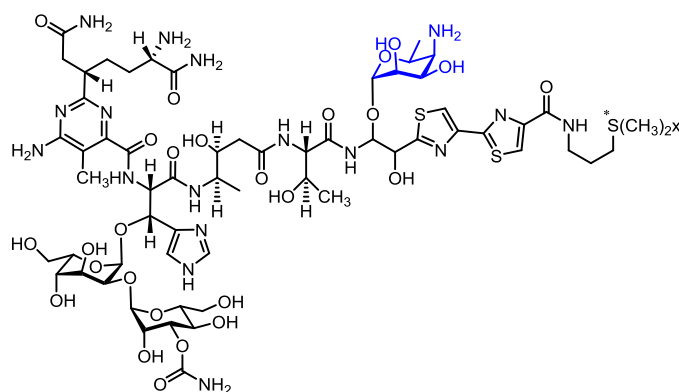
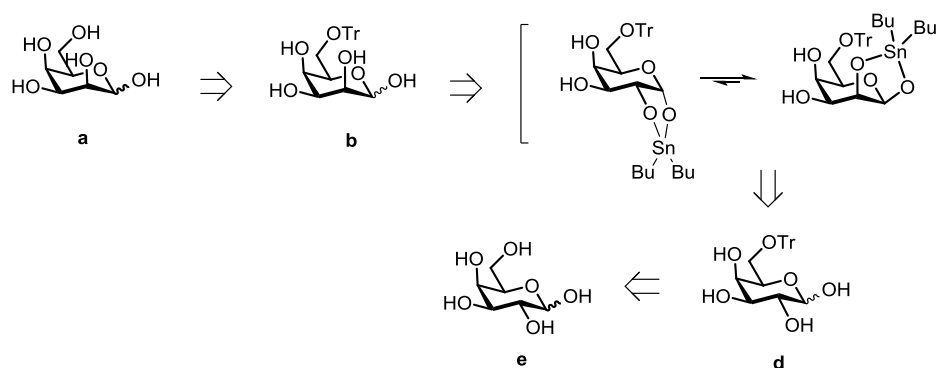


Figura 3.1. Antibiótico glicopeptídico antitumoral de la Tallisomicina.

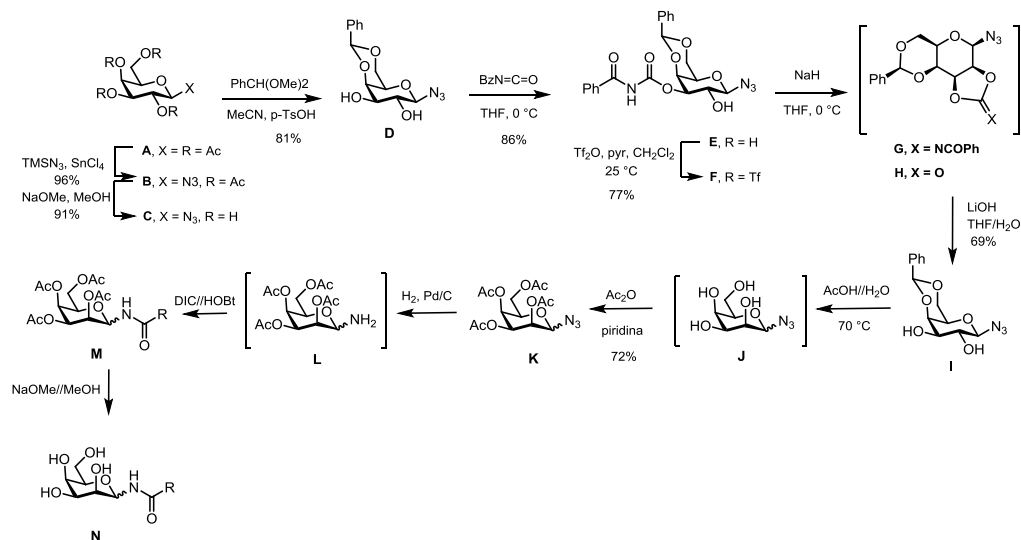
Nosotros hemos pensado en este azúcar porque la estereoquímica del carbohidrato de talosa permite la generación de redes de EH intramoleculares con centros dadores de EH cooperativos. Así, resulta atractivo para nosotros el desarrollo de una metodología para la producción de dicho azúcar.

Desde los años 80, se han usado diferentes metodologías para su preparación.^[13] Así, una estrategia que ha dado buenos resultados para la obtención del carbohidrato de D-Talosa en su forma desprotegida ha sido la publicada por Kovac.^[14] Dicha síntesis emplea como material de partida la D-Galactosa recurriendo a la epimerización del centro C2 como método para la obtención del esqueleto de talosa a través de la formación de estados de transición de acetales de estaño. (Ver esquema 3.2).



Esquema 3.2. Esquema retrosintético para la obtención de D-Talosa desde D-Galactosa.

Más recientemente, en nuestro grupo de investigación, se ha llevado a cabo la síntesis de derivados de talosa solubles en medios apolares, (compuesto **N** del esquema 3.3), empleando como material de partida la D-galactosa peracetilada. Dicha ruta sintética tiene como etapa clave la inversión de la configuración del centro C2 mediante el empleo del protocolo desarrollado por Knapp.^[15] Este protocolo consiste en la protección selectiva previa de los grupos hidroxilo en C-4 y C-6 de la galactosa en forma de bencilidenacetal (compuesto **D**) y en el posterior desplazamiento intramolecular del éster de trifluorometanosulfonato por un grupo carbamoilo vecino en la posición C3. (Compuesto **G**, ver esquema 3.3). Después de la hidrólisis de **H** el compuesto **I** se transforma en el correspondiente tetracetato **K** bajo condiciones estándar de desprotección y protección. A continuación, se lleva a cabo la reducción de la azida con H_2 y Pd/C obteniéndose la D-Talosamina (**AcO**)₄-D-Talosa-NH₂ (**L**) sin aislamiento de la misma para obtener finalmente el derivado de talosa deseado **N**.



Esquema 3.3. Síntesis del derivado de D-Talosa **N** desde D-Galactosa peracetilada **A** invirtiendo la configuración del centro C2 mediante el empleo del método descrito por Knapp.^[15]

En esta tesis emplearemos la estrategia desarrollada por Kovac como veremos más adelante para la obtención del derivado de talosa **β -D-Tal-NH₂ (28)**. En un futuro el intermedio b (esquema 3.2) podría ser empleado para acceder a 6-desoxy-talosa derivados.

Derivados de L azúcares

La mayoría de los azúcares de la serie D son compuestos comerciales baratos y se usan ampliamente como fuentes quirales en la síntesis de productos naturales complejos. Sin embargo, sus homólogos de la serie L son difíciles de obtener de fuentes naturales. Sólo la L-arabinosa, L-fucosa y L-rhamnosa se encuentran en la naturaleza y son asequibles comercialmente. Este hecho hace que, sobre todo recientemente, aparezcan publicaciones sobre la síntesis de L-carbohidratos y su aplicación en procesos biológicos.

Los L-azúcares a menudo forman parte de moléculas con un interés biológico relevante.^[16] Podemos citar la Bleomicina A₂, antibiótico glicopeptídico que contiene L-gulopiranos, y que tiene actividad antitumoral.^[17] La L-glucosa, por ejemplo, forma parte del producto natural (-)-littoralisone empleado para la pérdida de memoria^[18] y el ácido L-idurónico que es un componente de la heparina entre otros.

El objetivo de esta tesis relacionado con los L-azúcares es la obtención de las glico-oligoamidas **β -L-Man (7)** y **β -L-Gal (8)**. En concreto, la L-manosa se encuentra, por ejemplo,

como componente del polisacárido S88 con diversas aplicaciones en la industria alimentaria.^[19] (Ver figura 3.1). La L-galactosa podemos encontrarla como unidad constituyente del polisacárido rhamnogalactorunato II, (figura 3.2), que forma parte de las paredes celulares de determinadas plantas^[20] y como constituyente de productos naturales no poliméricos con actividad biológica relevante.^[21]

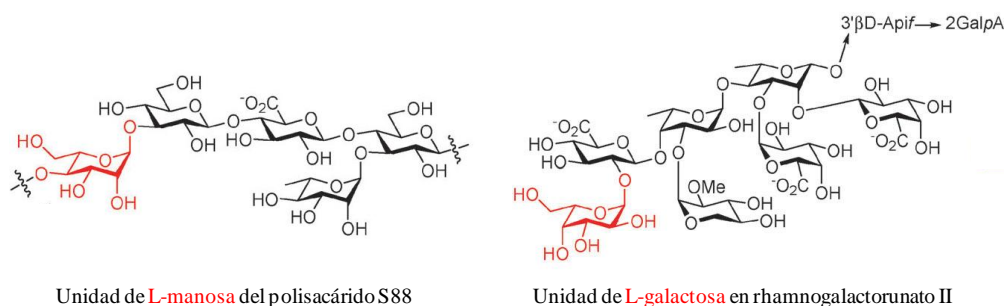


Figura 3.2. Estructura del polisacárido S88 y el rhamnogalactorunato II.

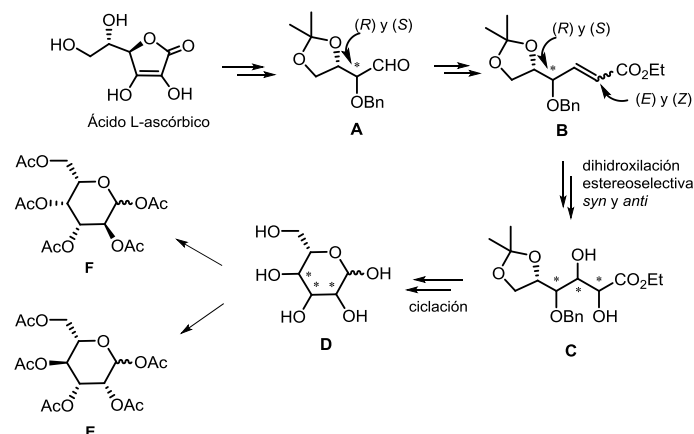
Debido a las propiedades biológicas que pueden presentar los carbohidratos no naturales y la pobre disponibilidad comercial de la mayoría de las L-hexosas cada vez son más los grupos de investigación que desarrollan síntesis nuevas y eficientes de estos compuestos.^[16,22]

Así, los métodos de obtención de carbohidratos de la serie L pueden provenir de síntesis *de novo*,^[23] empleando D-azúcares, (hexosas^[24] o pentosas^[22,25]), o bien a partir de L-carbohidratos asequibles.^[26]

Una forma de acceder a las L-hexosas a partir de D-azúcares es a través de procesos de epimerización ya que lo que diferencia a los carbohidratos de la serie D y L es la configuración en la posición C5.^a Así, la inversión de la configuración puede ocurrir mediante la apertura del ciclo o sin necesidad de ello.^[27]

Recientemente se ha publicado un método versátil para la obtención de ocho L-hexosas peracetiladas diastereoméricamente puras empleando el ácido L-ascórbico como material de partida^[23c] en un total de 13 etapas de reacción. (Ver esquema 3.4).

^a D-hexosas tienen una configuración *R* y L-hexosas tienen una configuración *S*



Esquema 3.4. Método desarrollado por Sasaki para la síntesis de L-hexosas **E** y **F**, (derivados de L-manosa y L-galactosa respectivamente), a través de la formación del ácido L-ascórbico en dos diastereoisómeros **A**, posterior obtención de los ésteres α,β insaturados **B**, dihidroxilación para dar los dioles **C** y ciclación para la obtención de las L-hexosas **D**.

La incorporación de los L-azúcares en las glico-oligoamidas es una parte del proyecto de investigación que se inicia en esta tesis. Nuestro objetivo inicial es tratar de estudiar las propiedades de interacción con el ADN al pasar de la serie **D** a la serie **L**.

Como primera aproximación a la síntesis de glico-oligoamidas que incorporan L-azúcares se podría optar por el empleo de la ruta desarrollada por Sasaki del esquema 3.4. Esta ruta permitiría la obtención de los azúcares desprotegidos de L-manosa y L-galactosa de fórmula **D** como productos de partida en la síntesis de nuestros amino azúcares. Sin embargo, a la vista del número de etapas necesarias para la obtención de **D**, **E** y **F** (esquema 3.4) decidimos inicialmente adquirir los carbohidratos desprotegidos comerciales^b de L-manosa y L-galactosa.

Por lo tanto nuestro objetivo es la obtención de los aminoazúcares tetraacetilados $(\text{AcO})_4\text{-}\alpha/\beta\text{-L-Man-NH}_2$ (**32.a/32.b**) y $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-NH}_2$ (**36**) a escala de 0.5 gramos para la preparación posterior de las glico-oligoamidas $\beta\text{-L-Man}$ (**7**) y $\beta\text{-L-Gal}$ (**8**) con el fin de probar la eficacia de las glico-oligoamidas como ligandos de ADN.

^b L-manosa: CAS: 10030-80-5; Alfa-Aesar; Ref: A17722-1g, 111.0 euros. L-galactosa: Número CAS: 15572-79-9; Alfa-Aesar; Ref: B21448-500mg, 327 euros.

3.1.2. Síntesis de oligoamidas heteroaromáticas.

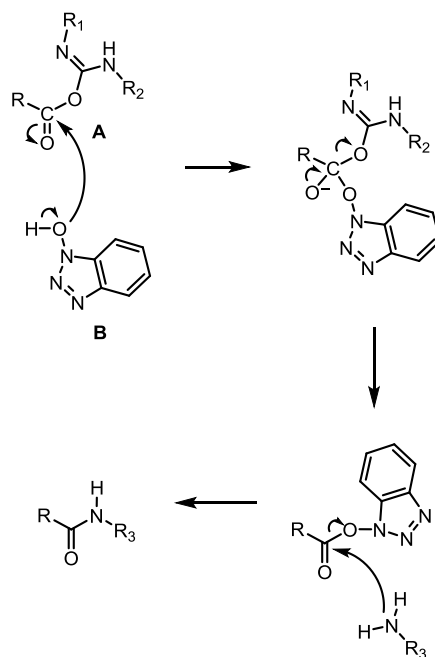
Existen dos metodologías de trabajo generales para llevar a cabo la síntesis de oligoamidas heteroaromáticas: la síntesis en disolución,^[28] método que podríamos denominar clásico, y la síntesis en fase sólida,^[29] metodología más moderna y muy útil para la síntesis de cadenas poliamídicas de gran tamaño.

Aunque la síntesis en fase sólida solventa los problemas asociados con el aislamiento y purificación de los productos intermedios y finales, esta metodología, presenta las desventajas de que la cantidad de oligoamida final que se puede preparar es, en general, pequeña y la necesidad de emplear un elevado exceso de reactivos caros.

Para la síntesis de oligoamidas heteroaromáticas en disolución se han desarrollado diferentes estrategias para acoplar los ácidos carboxílicos con las correspondientes aminas según se produzca una preactivación o que la activación del ácido sea *in situ*.

Además del empleo de cloruros de ácido, (método empleado para la síntesis de Netropsina y Distamicina),^[30] y tricloroacetilos para la preactivación del ácido, los ésteres de 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol han sido ampliamente utilizados^[1,28a,31]

Entre los métodos más empleados de activación *in situ* está el método de las carbodiimidas en combinación con el activante HOBt (esquema 3.5).^[28c,32]



Esquema 3.5. Mecanismo de activación por HOBt (1-hidroxi-1H-benzotriazol) cuando es usado como aditivo con una carbodiimida.

En nuestro grupo de investigación, hasta la fecha, éste ha sido el método empleado para la síntesis de glico-oligoamidas en disolución.

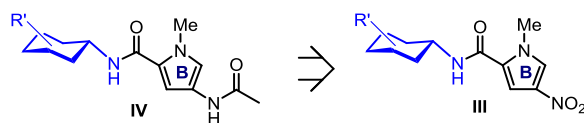
3.1.3. Síntesis de glico-oligoamidas en disolución.

En nuestro grupo de investigación, como ya se ha comentado al inicio de este capítulo, se han desarrollado dos rutas sintéticas para la obtención de glico-oligoamidas en disolución (ver esquema 3.1).

Así, la consecución de la Ruta A implica la preparación del ácido oligoamídico **HO-Py^B-γ-Py^A-Ind (18)**, activación de éste y la reacción entre **18** convenientemente activado con diferentes aminoazúcares **II** adecuadamente protegidos para la formación del enlace amidoglicosídico. (Ver esquema 3.1).

La consecución de la Ruta B implica la preparación de los glico-nitropirroles **III**, reducción del grupo nitro a amina de éstos, la preparación del ácido **HO-γ-Py-Ind (15)** y formación del enlace amida entre ambos para dar lugar a las glico-oligoamidas **I**. (Ver esquema 3.1).

Los modelos de hebra azúcar **IV** de fórmula general **Azúcar-Py-NHAc** se preparan a partir de los glico-nitropirroles **III** obtenidos por la Ruta B, por reducción del grupo nitro a amina seguido de acetilación. (Esquema 3.6).



Esquema 3.6. Esquema retrosintético para la preparación del modelo hebra azúcar **β-D-Tal-Py-NHAc** (**6**).

Siguiendo estas dos rutas sintéticas, se han preparado con anterioridad una serie de glico-oligoamidas **I^[1]** cuya diferencia es el tipo de carbohidrato unido al extremo C-terminal de la oligoamida. (Ver Figura 3.3). En esta tesis se van a estudiar las propiedades físico-químicas y de interacción de algunas de estas glico-oligoamidas sintetizadas anteriormente en nuestro grupo.^c Dichas glico-oligoamidas son las que se muestran en la figura a continuación. (Ver figura 3.3).

^c Ha sido necesario reproducir la síntesis de las glico-oligoamidas **β-D-Glc** (**3**) y **β-D-Gal** (**4**) para la obtención de cantidades suficientes que nos permitieran llevar a cabo los estudios estructurales y de interacción. Las glico-oligoamidas **β-D-Man** (**1**) y **6-desoxy-β-D-Man** (**9**) fueron sintetizadas con anterioridad en nuestro grupo pero el conocimiento de su estructura en el estado libre y los estudios de interacción con el ADN se incluye por primera vez en esta tesis

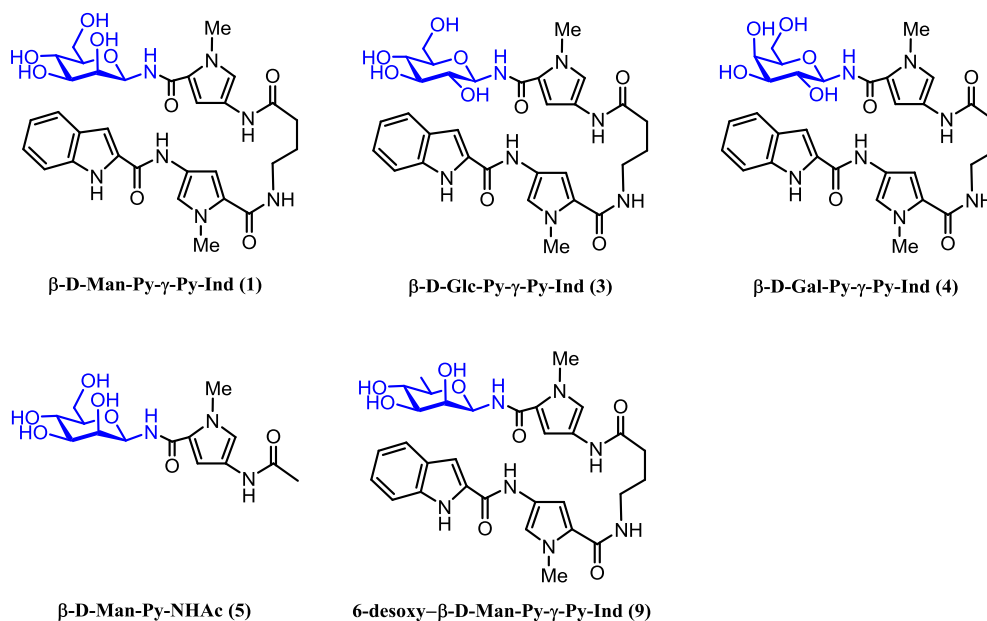


Figura 3.3. Glico-oligoamidas **I** sintetizadas anteriormente en nuestro grupo: **β-D-Man-Py-γ-Py-Ind (1)**, **β-D-Glc-Py-γ-Py-Ind (3)**, **β-D-Gal-Py-γ-Py-Ind (4)**, **β-D-Man-Py-NHAc (5)** y **6-desoxy-β-D-Man-Py-γ-Py-Ind (9)**.

Como se comentó en el capítulo 1, las nuevas glico-oligoamidas, con nuevos fragmentos sacarídicos, objeto de estudio de esta tesis, se han diseñado y sintetizado atendiendo a los objetivos fundamentales de esta tesis (capítulo 2).

Sin embargo, el objetivo de este capítulo de síntesis se centra en la preparación de nuevas glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie D con centros dadores de EH cooperativos, **β-D-Tal (2)**, y su modelo de hebra azúcar **β-D-Tal-Py-NHAc (6)**, así como glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie L con posibles centros dadores de EH cooperativos **β-L-Man (7)** y no cooperativos **β-L-Gal (8)**. (Ver Figura 3.4).

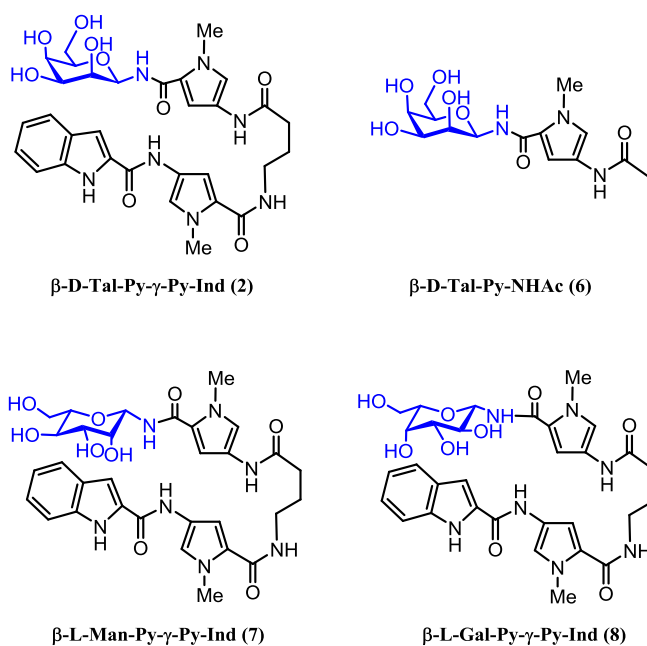
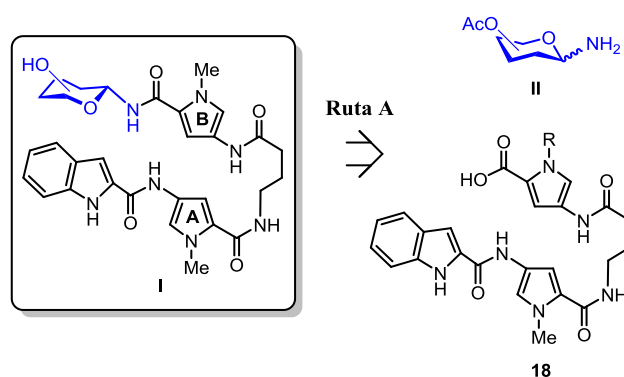


Figura 3.4. Estructura de las nuevas glico-oligoamidas **I** sintetizadas β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y el modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (6).

Teniendo en cuenta los antecedentes del grupo, la Ruta A se estimó como la más adecuada cuando se requiere sintetizar una familia de glico-oligoamidas **I** Azúcar-Py^B- γ -Py^A-Ind con diversidad en el carbohidrato.^[1] Por ello, en esta tesis comenzamos por explorar la Ruta A como vía de síntesis.

3.2. Empleo de la Ruta A. Preparación de los derivados acetilados de las glico-oligoamidas β -D-Tal (2), β -L-Man (7) y β -L-Gal (8). (Azúcar-NH₂ (II) + HO-Py^B- γ -Py^A-Ind (18). Ruta Lineal.

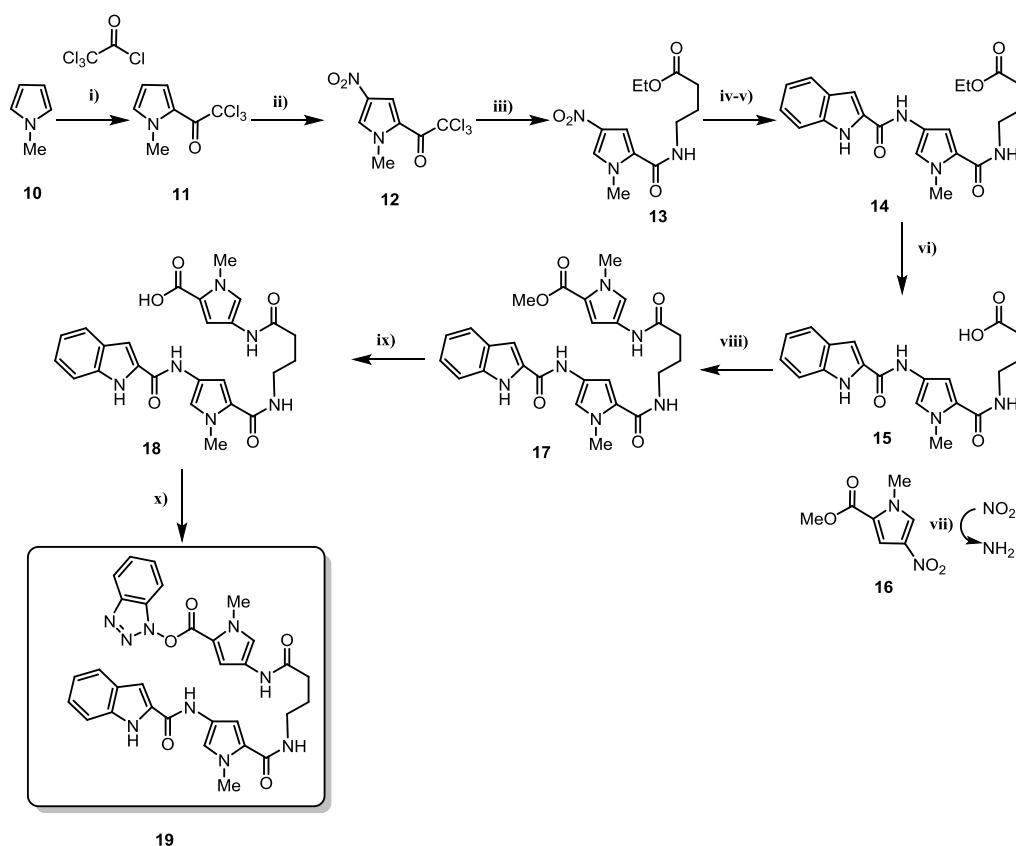
La síntesis de glico-oligoamidas **I** por la **Ruta A** consiste en la preparación del ácido oligoamídico HO-Py^B- γ -Py^A-Ind (18) así como los equivalentes sintéticos convenientemente protegidos de las aminas **II**. (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Esquema retrosintético para la síntesis de glico-oligoamidas **I** por la **Ruta A**. Aminas de fórmula general **II**: (AcO)₄-D-Tal-NH₂ (**28**), (AcO)₄-α/β-L-Man-NH₂ (**32.a**/**32.b**), (AcO)₄-β-L-Gal-NH₂ (**36**).

3.2.1. Preparación del compuesto BtO-Py^B-γ-Py^A-Ind (**19**).

La preparación del compuesto **BtO-Py^B-γ-Py^A-Ind** (**19**) se realizó según la metodología sintética desarrollada y publicada por nuestro grupo de investigación por la Dra. Concepción Badía Tortosa.^[1] (Ver Esquema 3.8).



Esquema 3.8. Preparación de **BtO-Py-γ-Py-Ind (19)**. Condiciones y reactivos: i) Cl_3CCl , Et_2O , $0^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 6 h, rto. 98%; ii) HNO_3 , Ac_2O , $i\text{PrOH}$, -40°C , 6 h, rto. 65%; iii) $\text{HCl}\cdot\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{Et}$, Et_3N , AcOEt , 2 h, rto. 99%; iv) NaBH_4 , Pd/C (5%), AcOEt/EtOH , rto. cuant.; v) ácido 1-*H*-indol-2-carboxílico, DIPC , HOBt , DMF , CH_2Cl_2 , rto. 70%; vi) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, rto. 95%; vii) NaBH_4 , Pd/C (5%), AcOEt/EtOH , rto. cuant.; viii) DIPC , HOBt , DMF , rto. 62%; ix) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{dioxano}/\text{H}_2\text{O}$, rto. 85%; x) TFFH , HOBt , DIEA , DMF , rto. 92%.

La síntesis del compuesto **19** está basada en el empleo de la combinación de métodos de activación de ácidos carboxílicos a través de tricloracetilos^[29a] y métodos que emplean 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (HOBt)^[33] para la formación del enlace amida por acoplamiento de las aminas aromáticas correspondientes obtenidas por reducción del grupo nitro mediante el empleo de NaBH_4 , Pd/C (5%) en AcOEt/EtOH .

Generalmente, las reacciones de acoplamiento^[34] en este tipo de oligoamidas heteroarómicas se caracterizan por rendimientos variables, largos tiempos de reacción (más de 24 h), numerosos subproductos, y difíciles purificaciones. Todo ello hace que la síntesis de carboxiamidas aromáticas sea muy problemática.^[29a] Por otra lado, los ácidos carboxílicos

aromáticos son generalmente inestables produciéndose descarboxilaciones. Por ello, teniendo en cuenta toda la problemática anterior, se decidió aislar el equivalente sintético del **HO-Py^B- γ -Py^A-Ind (18)** como éster activado **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (19)** derivado del 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol. Con su aislamiento se pretende disminuir tanto los tiempos de reacción como los subproductos formados en la reacción de acoplamiento para así facilitar la purificación de los productos deseados y aumentar los rendimientos.

Así, el éster activado **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (19)** se obtuvo a una escala de 1 g en un total de 9 etapas con un rendimiento global del 18%.

3.2.2. Preparación de las glicosilaminas anoméricas **II**: (AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (**28**), (AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**) y (AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**).

La Ruta A, (ver esquema 3.7, apartado 3.2), requiere la preparación de las aminas **II** convenientemente protegidas.

Se ha seleccionado el grupo acetato como protector de todos los hidroxilos presentes en los correspondientes aminoazúcares. Uno de los motivos es que su desprotección con MeONa/MeOH es compatible tanto con la estabilidad química del fragmento **-Py^B- γ -Py^A-Ind**^[35] como con la estrategia empleada para la preparación de los correspondientes azido y aminoazúcares anoméricos. Además, la desprotección de acetatos no induce epimerización del centro anomérico.^[36]

Así, a continuación se expone la síntesis de los amino azúcares **II**: (AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (**28**), (AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**) y (AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**). (Figura 3.5).

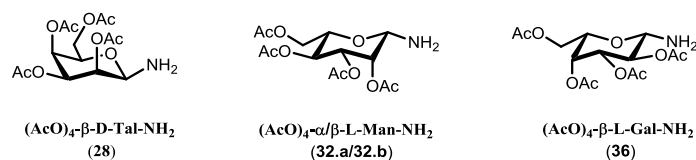
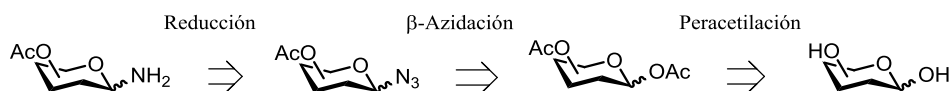


Figura 3.5. Glicosilaminas anoméricas **II** sintetizadas.

La estrategia general empleada para la síntesis de los amino derivados (AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**) y (AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**) implica una secuencia de tres etapas a partir de los correspondientes azúcares desprotegidos L-Manosa^[37] y L-Galactosa.^[38] (Ver esquema 3.9).



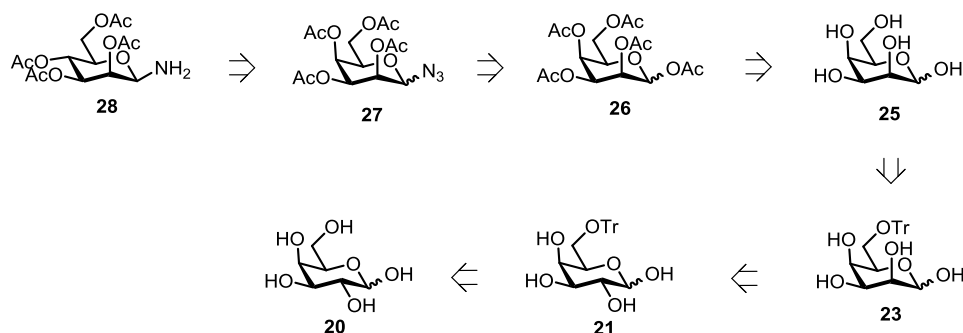
Esquema 3.9. Esquema retrosintético para la preparación de los acetil aminoazúcares **28**, **32.a/32.b** y **36**.

Sin embargo, la obtención de **(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28)**, requiere una metodología sintética más compleja ya que el carbohidrato en su forma desprotegida es comercialmente inasequible.^d Su síntesis se describe a continuación.

3.2.2.1. Preparación de **(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28)**.

La glicosilamina protegida **(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28)** fue sintetizada previamente en nuestro grupo^[39] empleando la ruta sintética descrita anteriormente en el esquema 3.3 de este capítulo (apartado 3.1.1). Sin embargo, en esta tesis, se ha elegido la ruta de síntesis llevada a cabo por Kovac^[14] para la obtención de la **D-Talosa** desprotegida **25** y que emplea la **D-Galactosa 20** como producto de partida. (Ver esquema retrosintético 3.10).

Esta ruta,^[14] conlleva sólo tres etapas de síntesis para la preparación de la **D-Talosa (25)** a partir de **D-Galactosa (20)**, por tanto, un menor número de etapas para la obtención de la amina deseada **(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28)** en comparación con la ruta empleada previamente en nuestro grupo del esquema 3.3. Además permitirá la obtención del intermedio **6-O-Tritil-D-Talosa (23)**, (ver esquema 3.10), lo que da lugar al acceso de glico-oligoamidas que incorporen 6-desoxy derivados de talosa en síntesis futuras.



Esquema 3.10. Esquema retrosintético para la obtención de D-Talopiranosilamina **28**.

^d D-Talosa: CAS: 2595-98-4; Sigma-Aldrich; Ref: 86265-250MG, 320.0 euros

La síntesis de (**AcO**)₄-**β-D-Tal-NH₂** (**28**), (esquema 3.11), pasa por intermedios donde la posición anomérica no está protegida (**21**, **23** y **25**). Esto ha dificultado la ruta de síntesis debido a que, aunque se obtiene el producto deseado en todos los casos, obtenemos mezcla de conformeros (piranosas y furanosas) y anómeros (α y β) en cada una de las etapas.

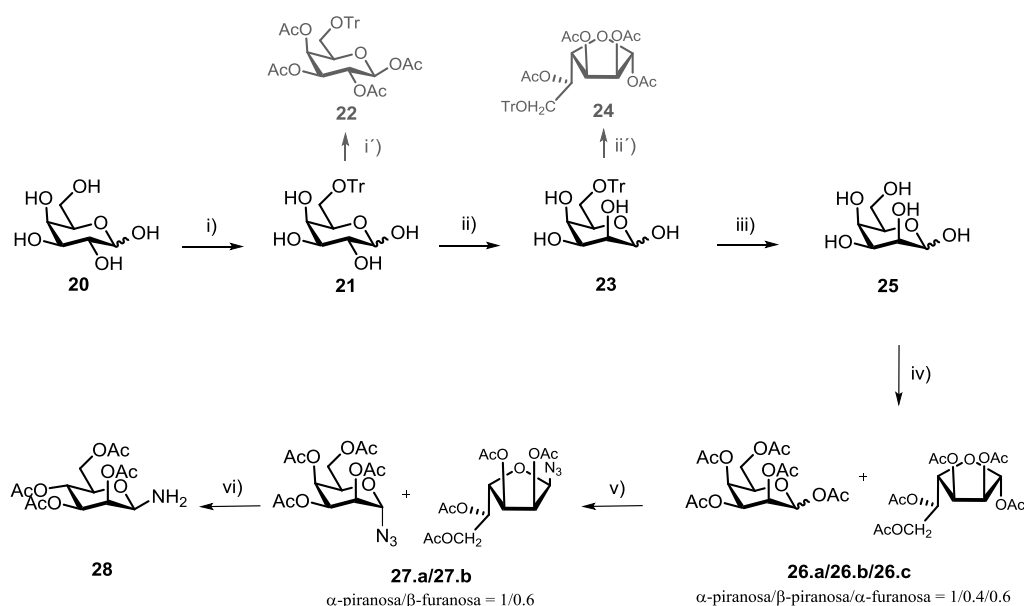
La obtención de la amina anomérica de talosa **28** comienza con la protección selectiva del hidroxilo en posición 6 mediante un grupo tritilo. (Ver esquema 3.11). Así, el compuesto desprotegido **D-Galactosa**^[40] (**20**) se hace reaccionar con cloruro de trifenilmetano, ((Ph)₃CCl), en piridina^[41] durante 15 h para dar, tras purificación cromatográfica en columna de gel de sílice, el compuesto **21**. Dicho compuesto, que posee un R_f de 0.42 en una mezcla CH₂Cl₂/MeOH/Trietilamina (90:10:1, v/v/v), fue caracterizado por espectrometría de masas, (*m/z* 422.2^e), y por RMN, por la aparición de las señales aromáticas correspondientes al grupo tritilo, como una mezcla compleja de conformeros y anómeros en CDCl₃ con un rendimiento del 75%.

Fue necesario recurrir a la acetilación de los grupos hidroxilos de **6-O-tritil-D-Galactosa**^[41] (**21**) con el fin de posibilitar su caracterización. La reacción se lleva a cabo con anhídrido acético y piridina y tras purificación mediante columna cromatográfica, se consiguió aislar y caracterizar el compuesto **22** en su forma β -piranosa con un 54% de rendimiento. (Ver esquema 3.11).

La siguiente etapa, que es la etapa clave de la ruta sintética, consiste en la inversión de la configuración del centro C2 del carbohidrato. Así, la mezcla de **6-O-tritil-D-Galactosa** (**21**) con óxido de tetrabutilestaño en benceno se agitó a reflujo para la eliminación azeotrópica de agua. Después de concentración, la mezcla de reacción se calienta en una mezcla de DMF/H₂O. Tras purificación cromatográfica en columna de gel de sílice, se obtiene **6-O-tritil-D-Talosa**^[14] (**23**) con un rendimiento del 54%. El compuesto **23** posee un R_f de 0.5, en una mezcla CH₂Cl₂/MeOH/Trietilamina (90:10:1, v/v/v). Se caracterizó **23** mediante espectroscopía de masas (*m/z* 422.2), y por RMN como una mezcla compleja de conformeros y anómeros. En este caso también fue necesaria la acetilación de **23** para su completa caracterización. La reacción de **23** se llevó a cabo con NaOAc y Ac₂O y, tras purificación por cromatografía en columna se identificó el anómero **24**^[42] en su forma α -furanosa con un 45% de rendimiento (Ver esquema 3.11). Se caracterizó el anómero **24** con ayuda de experimentos bidimensionales (TOCSY y NOESY). El nOe encontrado H-2/H-3 y la ausencia de nOe H-1/H-2 confirmaron la obtención del derivado de talosa **24** en su forma α -furanosa.

^e Masa obtenida por ionización química por electrospray (API-ES) en modo positivo.

La tercera etapa y última de la síntesis de Kovac consiste en la desprotección de la mezcla de isómeros **6-O-tritil-D-Talosa (23)** en medio ácido^[13h,14] para obtener la forma desprotegida de **D-Talosa (25)**, a escala de gramos. Tras purificación cromatográfica en columna de gel de sílice empleando como eluyente un gradiente de la mezcla CH₂Cl₂/MeOH, (9:1→3:1, v/v) se obtuvo **25** con un rendimiento del 90%. Dicho compuesto se caracteriza por espectrometría de masas (m/z 180.1^f) y por RMN. El espectro de ¹H-RMN muestra la desaparición de las señales aromáticas correspondientes al grupo tritilo. Por otro lado el espectro ¹³C-RMN revela la presencia de una mezcla compleja de confórmers y anómeros^[43] α -piranosa/ β -piranosa/ α -furanosa/ β -furanosa^f en D₂O en una proporción aproximada 1/0.8/0.4/0.2. Dicha mezcla fue determinada de forma aproximada mediante el espectro de ¹³C que se muestra en la figura 9.1 del anexo.



Esquema 3.11. Preparación del aminoazúcar de D-Talosa (**28**) desde D-Galactosa **20** invirtiendo la configuración en C-2 mediante deshidratación azeotrópica. Condiciones y reactivos: i) (Ph)₃CCl, piridina, 60 °C, 15 h, rto. 75%; i') Ac₂O, piridina, 15 h, rto. 54%; ii) 1) Bu₂SnO, benceno, 80 °C, 2.5 h. 2) DMF/H₂O, 60 °C, 15 h, rto. 54%; ii') Ac₂O, piridina, 15 h, rto. 60%; iii) AcOH/H₂O, 60 °C, 3h, rto. 90%; iv) Ac₂O, piridina, 15 h, rto. 88%; v) TMSN₃, SnCl₄, CH₂Cl₂, 3 h, rto. 80%; vi) H₂, Pd/C (5%), CH₂Cl₂, 2 h, rto. 92 %.

^f El compuesto **D-Talosa 25** ha sido caracterizado anteriormente por Pfeffer et al. haciendo uso de efectos isotópicos mediante deutерación parcial de los grupos hidroxilo y asignación de las resonancias de ¹³C-RMN. Los autores obtuvieron **25** como una mezcla compleja de confórmers y anómeros α -piranosa/ β -piranosa/ α -furanosa/ β -furanosa en una proporción 4/3/2/1 en D₂O.^[43]

La acetilación de los grupos hidroxilo de la **D-Talosa 25** se lleva a cabo empleando anhídrido acético y piridina.^[44] Tras purificación por columna cromatográfica, se obtiene el compuesto **(AcO)₅-D-Talosa (26)**^[44] como mezcla de anómeros y confórmers α -piranosa/ β -piranosa/ α -furanosa,^g **(26.a)**^[45]/**26.b/26.c**, en una proporción 1/0.4/0.6^h y con un rendimiento del 88%. (Ver esquema 3.11). En el proceso de purificación por cromatografía se consiguió aislar cantidades analíticas de los isómeros **26.b** y **26.c** para su completa caracterización. (Ver apartado 7.2.1.4 del capítulo: parte experimental).

La siguiente etapa consiste en la preparación de la azida anomérica **27**. El tratamiento del compuesto peracetilado como mezcla de anómeros y confórmers **26.a/26.b/26.c** con TMSN₃ y tetracloruro de estaño condujo a la azida anomérica **(AcO)₄-D-Talosa-N₃ (27)** que tras purificación cromatográfica resultó ser una mezcla de anómeros α -piranosa/ β -furanosa, **(27.a/27.b)** en una proporción 1/0.6^h con un rendimiento del 80%. En el proceso de purificación consiguió aislarse una cantidad suficiente del isómero **27.a** para su completa caracterización. (Ver apartado 7.2.1.7 del capítulo parte experimental: síntesis de las glico-oligoamidas).

La última etapa de la síntesis fue la hidrogenación del grupo azida para obtener la amina correspondiente. Dicha etapa se llevó a cabo en atmósfera de hidrógeno en CH₂Cl₂ anhidro empleando Pd/C (5%) como catalizador. Así, la amina anomérica de talosa se obtuvo de forma mayoritariaⁱ en su forma β -piranosa **(AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (28)** con un rendimiento del 92%. (Ver esquema 3.11).

En conclusión, se ha obtenido la amina derivada de talosa **(AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (28)** en una secuencia de 6 etapas con un rendimiento global del 24% a una escala de 0.3 g.

^g En el caso de la obtención de mezcla de anómeros y confórmers, éstos se han identificado haciendo uso de los experimentos bidimensionales (NOESY, TOCSY y HSQC) de los crudos de reacción.

^h La proporción de los confórmers y anómeros se determinó por integración de las señales de los protones anoméricos de los isómeros en el espectro de ¹H-RMN.

ⁱ En el espectro de ¹H-RMN del compuesto **28** se observa la presencia, aunque muy minoritaria, de posibles confórmers y/o anómeros el derivado de talosamina no se pudieron identificar. La purificación cromatográfica no conduce a un mayor grado de pureza de **28**. Por lo tanto, la glicosilamina **28** se empleó directamente en la reacción de acoplamiento sin purificación por columna cromatográfica

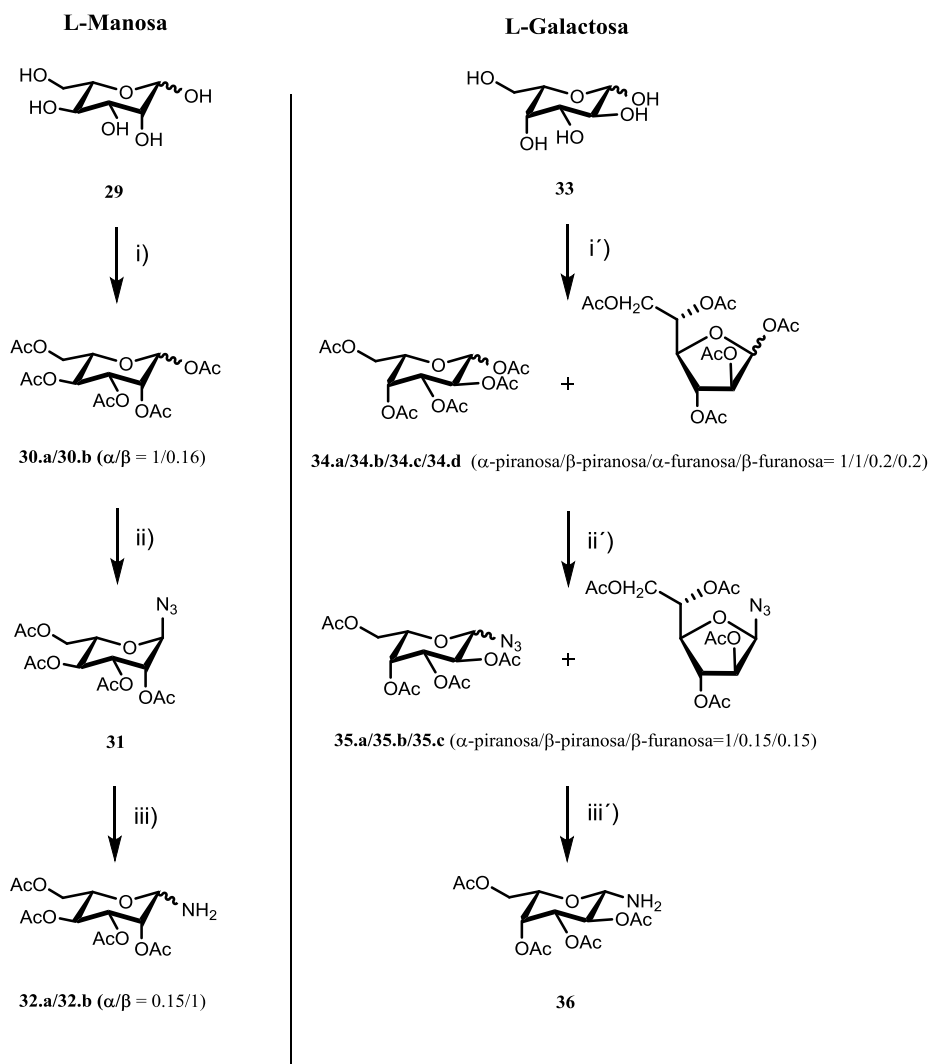
3.2.2.2. Preparación de (AcO)₅- α/β -L-Man-NH₂ (32.a/32.b) y (AcO)₅- β -L-Gal-NH₂ (36).

Las glicosilaminas anoméricas convenientemente protegidas de **L-Manosa** (32.a/32.b) y **L-Galactosa** (36) se obtuvieron siguiendo la ruta sintética que se muestra en el esquema 3.3. (Ver esquema 3.12).

El tratamiento de los compuestos desprotegidos **L-Manosa**^[37] (29) y **L-Galactosa**^[38] (33) con anhídrido acético y piridina dio lugar a la obtención de los compuestos peracetilados (AcO)₅-L-Manosa (30) y (AcO)₅-L-Galactosa (34).

En el caso de la **L-Manosa**, se obtuvo el derivado peracetilado (AcO)₅- α/β -L-Man (30) como mezcla de anómeros de piranosa α -piranosa/ β -piranosa, (30.a/30.b) en una proporción 1/0.16 con un rendimiento del 86%.

En el caso de la **L-Galactosa**, se obtuvo el derivado peracetilado (AcO)₅-L-Galactosa (34) como una mezcla de confórmers de piranosa y furanosa y anómeros α y β , α -piranosa/ β -piranosa/ α -furanosa/ β -furanosa, (34.a/34.b/34.c/34.d) en una proporción 1/1/0.2/0.2 con un rendimiento del 97% (Ver esquema 3.12).



Esquema 3.12. Preparación de los aminoazúcares derivados de L-Manosamina (**32.a/32.b**) y L-Galactosamina **36**. Condiciones y reactivos: i) Ac_2O /Piridina, 10 h, rto. 86%; ii) TMSN_3 , SnCl_4 , CH_2Cl_2 , 3h, rto. 70%; iii) H_2 , Pd/C (5%), CH_2Cl_2 , 2 h, rto. 95%; i') Ac_2O , piridina, 15 h, rto. 97%; ii') TMSN_3 , SnCl_4 , CH_2Cl_2 , 4h, rto. 80%; iii') H_2 , Pd/C (5%), CH_2Cl_2 , 2 h, rto. 95%.

La segunda etapa fue la preparación de las correspondientes azidas anoméricas. El tratamiento de la mezcla de los compuestos peracetilados de **L-Manosa** (**30.a/30.b**) y **L-Galactosa**, **34.a/34.b/34.c/34.d**, (en la proporción de anómeros obtenida), con trimetil silil azida (TMSN_3)^[46] y tetracloruro de estaño (SnCl_4) condujo a las correspondientes azidas anoméricas. En el caso de la **L-Manosa** se obtuvo únicamente el anómero puro (AcO)₄- β -**L-Man-N₃** (**31**) con un 70% de rendimiento y, en el caso de la **L-Galactosa**, se obtuvo (AcO)₄-

L-Galactosa-N₃ como mezcla de anómeros y confórmers, (α -piranosa/ β -piranosa/ β -furanosa) (**35.a/35.b/35.c**) en una proporción 1/0.15/0.15 con un rendimiento del 80%.

La última etapa fue la reducción del grupo azida para obtener la amina correspondiente.^[47] El procedimiento experimental, para ambos derivados, consistió en poner bajo atmósfera de hidrógeno a presión atmosférica cada una de las azidas por separado **31** y **35.a/35.b/35.c** en CH₂Cl₂ anhidro y emplear Pd/C (5%) como catalizador. Así, se obtuvieron las aminas^j (AcO)₅- α / β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**) y (AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**) con rendimientos del 95% en ambos casos. La L-Manosamina se obtuvo como mezcla de anómeros de piranosa α / β , (**32.a/32.b**), en una proporción 0.2/1, sin embargo la L-Galactosamina se obtuvo como único anómero (AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**).

En la figura 3.6 se dan los datos espectroscópicos de ¹H-RMN más relevantes de las aminas (AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (**28**), (AcO)₄- α / β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**) y (AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**).

En concreto las constantes de acoplamiento $J_{1,2}$ y los nOes han permitido definir la conformación del anillo de azúcar y la configuración de la posición anomérica de las aminas **28**, **32.a/32.b** y (**36**). (Ver figura 3.6).

^j Los intentos de purificación, por cromatografía en gel de sílice, de las aminas **28**, **32.a/32.b** y **36**, no mejoró el grado de pureza del compuesto, y se observó que en ocasiones, se producían anomerizaciones tras la purificación. Así, se decidió emplear las aminas directamente en la reacción de acoplamiento para la formación del enlace amida sin purificación por columna cromatográfica.

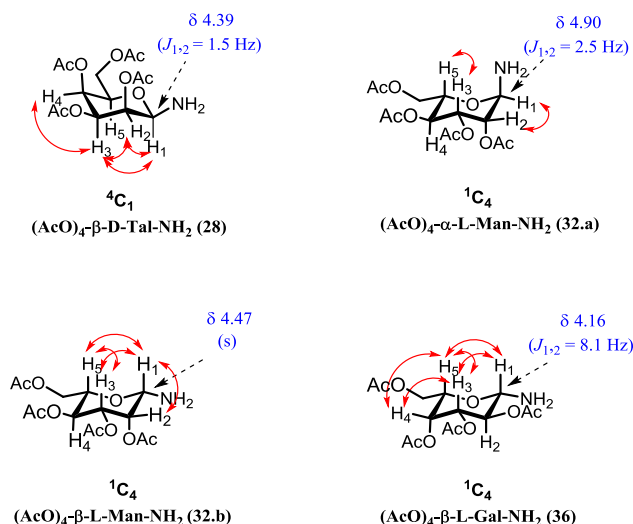


Figura 3.6. Desplazamientos químicos (ppm), constantes de acoplamiento $J_{1,2}$ (Hz) y nOes detectados de las glicosilaminas **28**, **32.a**, **32.b** y **36** en $CDCl_3$, a 500 MHz.

Los nOes observados (véase la Figura 3.6) y el valor de $J_{1,2} = 1.5$ Hz de **(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28)** están de acuerdo con una configuración anomérica β y una conformación de anillo 4C_1 que es la más estable.^[48]

El derivado **(AcO)₄-α-L-Man-NH₂ (32.a)** posee una $J_{1,2} = 2.5$ Hz y muestra un nOe H-3/H-5. Ambos parámetros son característicos de una conformación de anillo de piranosa 1C_4 del anillo de piranosa.^[49] Además la ausencia de nOes H-1/H-3 y H-1/H-5 y la constante de acoplamiento pequeña de 2.5 Hz están de acuerdo con una configuración α del carbono anomérico.

La amina **(AcO)₄-β-L-Man-NH₂ (32.b)** posee una $J_{1,2} < 0.5$ Hz. Además, puede observarse que existen nOes H-1/H-3 y H-1/H-5. En este caso, estos parámetros son característicos de una conformación 1C_4 y una configuración β del carbono anomérico.

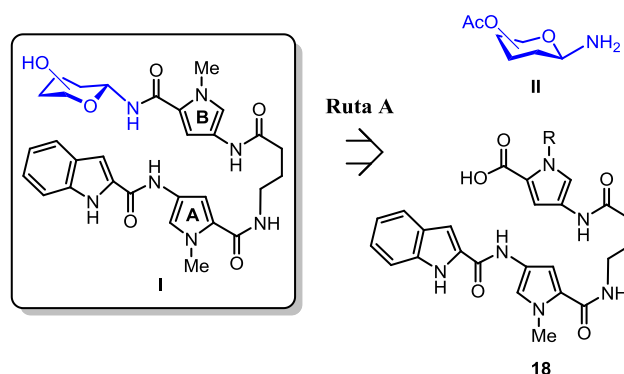
El compuesto **(AcO)₄-β-L-Gal-NH₂ (36)** presenta nOes H-1/H-3, H-1/H-5 y H-3/H-5, que están de acuerdo con una conformación 1C_4 y una configuración β del centro anomérico. Además, el valor de la constante de acoplamiento $J_{1,2} = 8.1$ Hz confirma la configuración β del centro anomérico, debido a la disposición trans diaxial entre los protones H-1 y H-2.

Como conclusión, se han obtenido las glicosilaminas de L-manosa **(AcO)₄-α/β-L-Man-NH₂ (32.a/32.b)** (0.2/1) y L-galactosa **(AcO)₄-β-L-Gal-NH₂ (36)** empleando una secuencia de tres etapas desde el azúcar desprotegido con un rendimiento global del 57% y 75% respectivamente.

Las glicosilaminas **28**, **32.a/32.b** y **36** se emplearon sin purificación por columna cromatográfica en la reacción de acoplamiento sin purificación por columna cromatográfica para la formación del enlace amida.

3.2.3. Preparación de los derivados acetilados de las glico-oligoamidas I: β -D-Tal (**2**), β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**) por la Ruta A.

Después de obtener el ácido oligoamídico **HO-Py^B- γ -Py^A-Ind (**18**)** y las aminas **II** convenientemente protegidas, se procedió a llevar a cabo la reacción de acoplamiento para la formación del enlace amido-glicosídico por la **Ruta A**. (Esquema 3.13).



Esquema 3.13. Esquema retrosintético para la síntesis de glico-oligoamidas β -D-Tal (**2**), β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**) por la Ruta A.

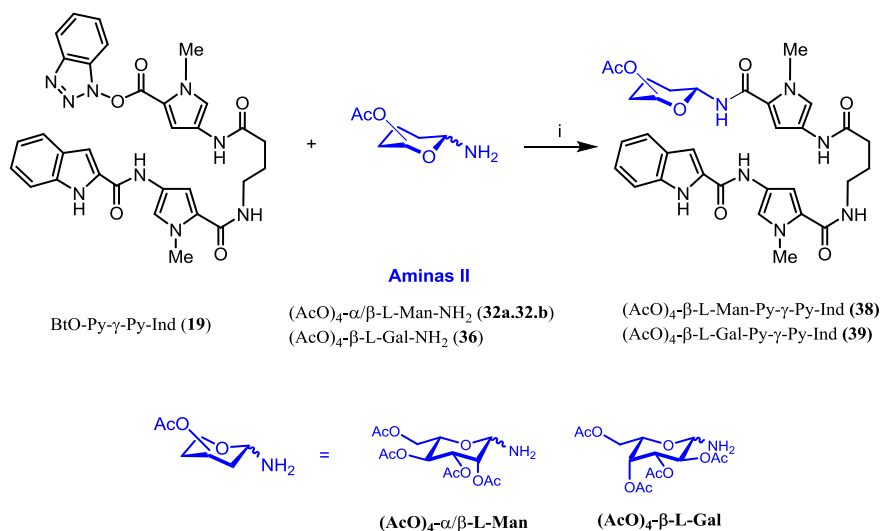
En nuestro laboratorio se ha realizado un estudio de diferentes métodos de acoplamiento entre el ácido oligoamídico **18** y la amina,^[50] tanto *in situ* como por preactivación del ácido. El método más efectivo, para las glico-oligoamidas hasta ahora sintetizadas, resultó ser el que emplea el ácido activado aislado **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (**19**)**.^[1]

Así, en esta tesis, este será uno de los métodos usados para la síntesis de los derivados acetilados **(AcO)₄- β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**37**)**, **(AcO)₄- β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (**38**)** y **(AcO)₄- β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**39**)**, precursores de las glico-oligoamidas objeto de estudio de esta memoria β -D-Tal (**2**), β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**).

Se hizo reaccionar el éster activado **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (**19**)** con un exceso, (2 equivalentes), de cada una de las aminas por separado: **(AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (**28**)**, **(AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**)** y **(AcO)₄- β -L-Gal-NH₂ (**36**)**.

Tras 96 h en presencia de DIEA en DMF a temperatura ambiente y después de purificación mediante columna cromatográfica de cada una de las reacciones se aislaron los derivados acetilados **(AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (38)** y **(AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (39)** con un rendimiento del 28 y 60% respectivamente. (Esquem 3.14).

La reacción de la talosamina **28** con **BtO-Py^B-γ-Py^A-Ind (19)**, sin embargo, no condujo al producto de acoplamiento esperado **(AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (37)**.



Esquema 3.14. Preparación de los derivados acetilados **(AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (38)** y **(AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (39)** mediante la Ruta A. Condiciones y reactivos: i) DIEA, DMF, t.a, 72 h.

En la reacción de acoplamiento para la obtención de **38** y **39** pudo observarse la formación de productos no deseados. Dichos productos fueron los derivados de *N*-acetilglicosamina **(AcO)₃-β-L-Man-NHAc (40)** y **(AcO)₃-α-L-Gal-NHAc (41)^k** cuya estructura se muestran en la figura a continuación (ver figura 3.7).

^k El compuesto **40** se obtiene en la reacción de acoplamiento con un 42 % de rendimiento, mientras que el derivado **41** se obtiene con un 15% de rendimiento.

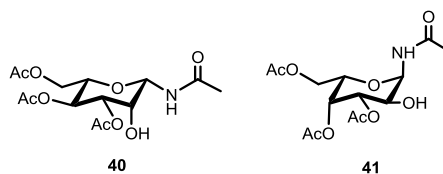
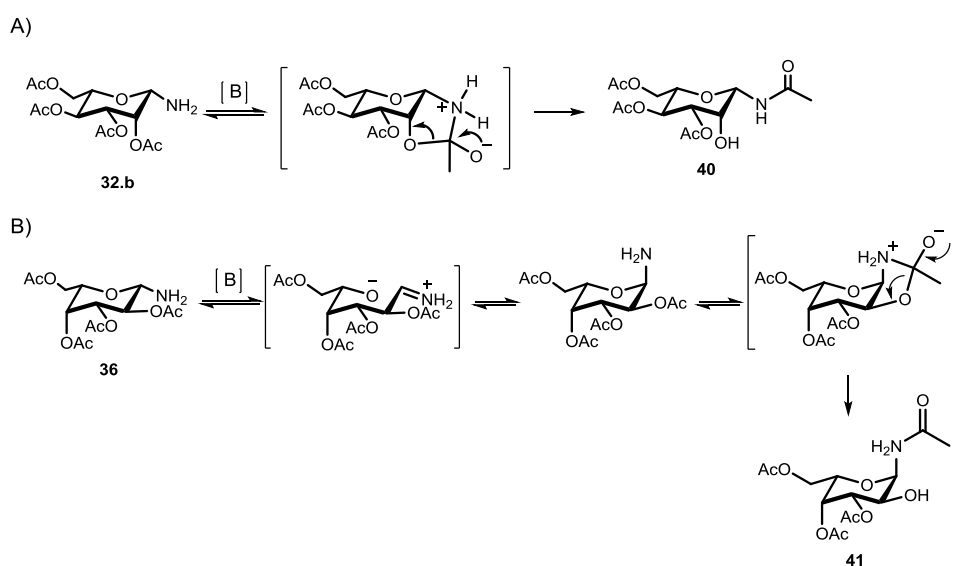


Figura 3.7. Estructura de las N-acetil-glicosilaminas de L-Manosa (**40**) y L-Galactosa (**41**).

El mecanismo para la formación de los compuestos **40** y **41** se propone en el esquema 3.15. Dicho mecanismo transcurre en medio básico^[51] con migración intramolecular irreversible del grupo acetilo, desde la posición C-2 a la posición anomérica para la formación de la acetamida correspondiente. La migración se produce a través de un intermedio cíclico de 5 miembros como se detalla en el esquema a continuación. (Esquema 3.15).



Esquema 3.15. Mecanismos A y B para la formación de los subproductos **40** y **41**.

Como conclusión, la Ruta A ha permitido obtener los derivados acetilados de L-Manosa (**(AcO)₄-β-L-Man-Py-γ-Py-Ind (38)**) y L-Galactosa (**(AcO)₄-β-L-Gal-Py-γ-Py-Ind (39)**) con rendimientos del 28 y el 60% respectivamente. El bajo rendimiento obtenido para el compuesto **38** se atribuye a que la configuración del acetato en posición C2 axial favorece la formación del intermedio cíclico de 5 miembros para dar el producto no deseado **40**.

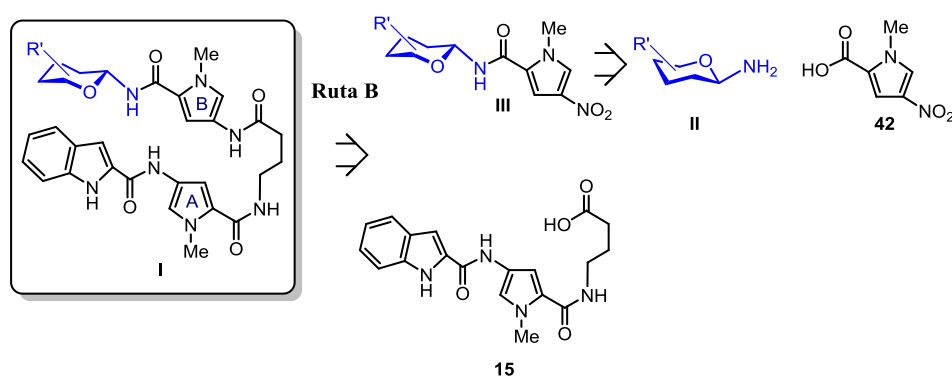
Para tratar de minimizar la formación de los productos no deseados de N-acetil-glicosamina en la reacción de acoplamiento se optó por hacer la activación del ácido **18** *in situ* mediante el empleo de PyBOP^[52] como grupo activante.¹

Dicha reacción se ensayó no sólo con el derivado de talosa **28** si no también con el de galactosa **36**. Desafortunadamente, en ningún caso se observó producto de acoplamiento entre cada una de las aminas (AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (**28**) y (AcO)₄-β-L-Gal-NH₂ (**36**) y el ácido HO-Py^B-γ-Py^A-Ind (**18**).

Teniendo en cuenta la problemática anterior nos planteamos explorar la Ruta B para la obtención de los derivados (AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**37**), (AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (**38**) y (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**39**).

3.3. Empleo de la Ruta B. Preparación de las glico-oligoamidas β-D-Tal (**2**), β-L-Man (**7**) y β-L-Gal (**8**). (Azúcar-Py^B-NO₂ + HO-Py^A-Ind). Ruta Convergente.

El empleo de la Ruta B para la obtención de los derivados acetilados **37-39** de fórmula general (AcO)₄-Azúcar-Py^B-γ-Py^A-Ind sigue el esquema retrosintético que se muestra a continuación. (Esquema 3.16).



Esquema 3.16. Esquema retrosintético para la síntesis de las glico-oligoamidas β-D-Tal (**2**), β-L-Man (**7**) y β-L-Gal (**8**) por la Ruta B.

¹ Una de las ventajas del empleo de este tipo de sales de fosfonio, como reactivos de acoplamiento es que no se obtiene como subproducto la urea generada en el método que emplea carbodiimidas, costosa de eliminar en el proceso de purificación

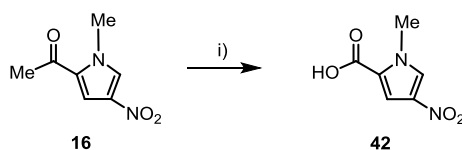
Las glico-oligoamidas **I** se preparan a partir de los glico-nitropirroles **III** y el ácido **HO- γ -Py^A-Ind (15)** mediante una secuencia de activación del ácido, reducción del grupo nitro a amina de los glico-nitropirroles **III** correspondientes y acoplamiento de ambos para formar el enlace amida. (Esquema 3.16).

Los glico-nitropirroles **III** se preparan a partir de los diferentes aminoazúcares convenientemente protegidos (aminas anoméricas **II**) y el 2-ácido carboxílico *N*-metil pirrol **42**, mediante una secuencia de dos pasos: activación del ácido y acoplamiento con las aminas correspondientes en medio básico. (Esquema 3.16).

El ácido **HO- γ -Py^A-Ind (15)** es común en las dos rutas (Ruta A y Ruta B) y su preparación está descrita previamente en el esquema 3.8. (Ver sección 3.2.1, esquema 3.8).

3.3.1. Preparación del 2-ácido carboxílico *N*-metil pirrol.^[53] **HO-Py^B-NO₂ (42)**.

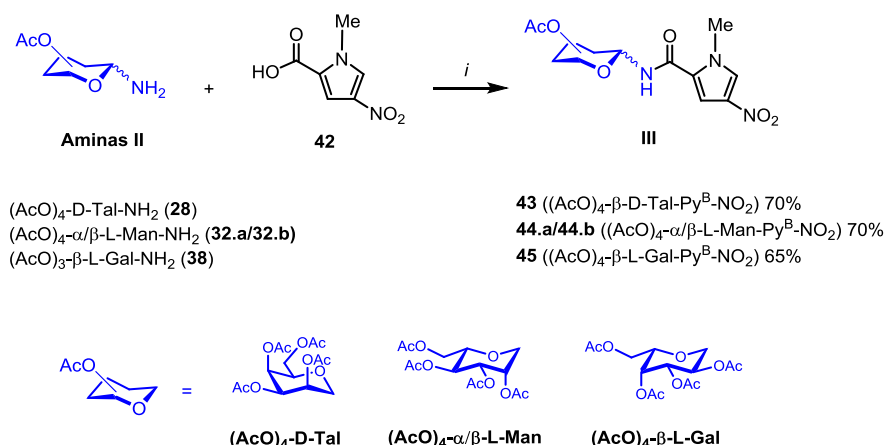
El 2-ácido carboxílico *N*-metil nitropirrol **42** se preparó mediante la hidrólisis del éster **MeO-Py^B-NO₂ (16)**, (sección 3.2.1, esquema 3.8), con LiOH·H₂O en una mezcla THF/H₂O. Tras aislamiento y purificación se obtuvo el ácido **HO-Py^B-NO₂ (42)** con un rendimiento del 95%. (Esquema 3.17).



Esquema 3.17. Hidrólisis del éster **MeO-Py^B-NO₂ (16)** para la obtención del ácido **HO-Py^B-NO₂ (42)**. Condiciones y reactivos: LiOH·H₂O, THF/H₂O, 24 h, t.a.

3.3.2. Preparación de los glico-nitropirroles **III**, **Azúcar-Py^B-NO₂**.

Los glico-nitropirroles **III** se prepararon mediante activación *in situ* del 2-ácido carboxílico **HO-Py^B-NO₂ (42)**. La reacción de acoplamiento con las aminas **III** se realizó empleando DMF como disolvente (Esquema 3.18).



Esquema 3.18. Preparación de los compuestos **43**, **44.a/44.b** y **45**. Condiciones y reactivos: PyBOP, DIEA, DMF, 24 h, t.a.

En este caso, en lugar de emplear el método de las carbodiimidas, (HOBt/DIPC^[1]), anteriormente utilizado en nuestro grupo, para la activación *in situ* del ácido **HO-Py^B-NO₂** (**42**), se empleó la sal de fosfonio PyPOB,^[52] (para evitar la formación de la urea DIPU generada como subproducto en el método de las carbodiimidas), y DIEA en DMF durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se añadieron, por separado, las aminas correspondientes **(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂** (**28**), **(AcO)₄-α/β-L-Man-NH₂** (**32.a/32.b**) y **(AcO)₄-β-L-Gal-NH₂** (**36**) en cantidades estequiométricas. Después de agitar la mezcla de reacción durante 48 h a temperatura ambiente, y tras purificación cromatográfica se obtuvieron en forma de un único anómero los compuestos **(AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-NO₂** (**43**) y **(AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-NO₂** (**45**) con rendimientos del 70 y 65% respectivamente. (Ver esquema 3.18). En el caso del derivado de L-Manosa, se obtuvo el compuesto **(AcO)₄-α/β-L-Man-Py^B-NO₂** (**44.a/44.b**),^m como una mezcla α/β en la misma proporción (0.2/1) que el amino azúcar de partida **32.a/32.b** con un rendimiento del 70%. En este caso no se observó la aparición de los productos derivados de *N*-acetilglicosamina **(AcO)₃-β-L-Man-NHAc** (**40**) y **(AcO)₃-α-L-Gal-NHAc** (**41**) obtenidos como productos no deseados en la reacción de acoplamiento por la Ruta A.

En la figura 3.8 se muestran los datos espectroscópicos de ¹H-RMN más relevantes de cada uno de los anómeros α/β (**44.a/44.b**) del derivado de L-Manosa.

^m El espectro de ¹H-RMN de la mezcla **(AcO)₄-α/β-L-Man-Py^B-NO₂** (**44.a/44.b**) se muestra en la figura 9.2 del Anexo.

La mezcla de anómeros no pudo separarse por columna cromatográfica, sin embargo, si fue posible su asignación de los dos compuestos **44.a** y **44.b** en espectro de ^1H -RMN.

En el espectro de protón, el derivado $(\text{AcO})_4\text{-}\alpha\text{-L-Man-Py}^B\text{-NO}_2$ (**44.a**) muestra señales observadas a 5.67, 5.13 y 9.19 ppm y se asignaron a H-1, H-2 y NH-5 respectivamente. Dicho derivado posee unas constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-1/NH-5}} = 9.2\text{ Hz}$ y $^3J_{\text{H-1/H-2}} = 3.7\text{ Hz}$ que están de acuerdo con una configuración α del centro anomérico. Además la ausencia de nOes H-1/H-3 y H-1/H-5 y el valor pequeño de la constante de acoplamiento $^3J_{\text{H-1/H-2}} = 3.7\text{ Hz}$ confirman una conformación de anillo $^1\text{C}_4$. (Ver figura 3.8, izquierda).

Por otro lado, el derivado $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Man-Py}^B\text{-NO}_2$ (**44.b**) muestra unas señales en el espectro de ^1H -RMN a 5.85, 5.27 y 8.98 ppm que se atribuyeron a H-1, H-2 y NH-5 del anómero β . Dicho derivado posee unas constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-1/NH-5}} = 8.4\text{ Hz}$ y $^3J_{\text{H-1/H-2}} = 1.3\text{ Hz}$ que están de acuerdo con una configuración β del centro anomérico. Además la presencia de nOes H-1/H-3 y H-1/H-5 confirma una conformación de anillo $^1\text{C}_4$ y la configuración β del centro anomérico. (Ver figura 3.8, derecha).

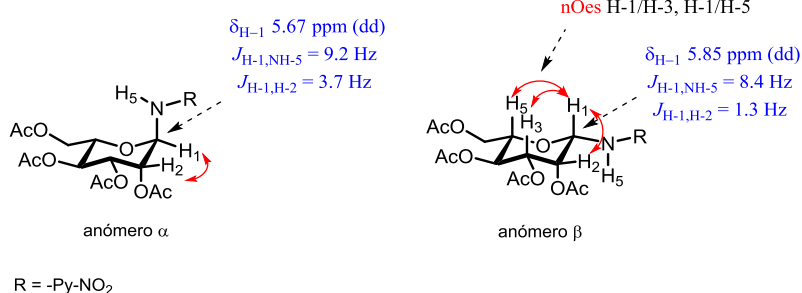


Figura 3.8. Representación de desplazamientos químicos del protón anomérico (δ), constantes de acoplamiento (J) y nOe de los anómeros α (**44.a**) y β (**44.b**) de L-manosa.

Finalmente, en la tabla 3.1 se muestran los rendimientos y las proporciones α/β obtenidas para la preparación de los glico-nitropirroles **III** por activación *in situ* del 2-ácido carboxílico *N*-metil pirrol **42**.

Tabla 3.1. Preparación de los glico-nitropirroles **41**, **42.a/42.b** y **43**.

Amina III	Ácido	Producto	α/β^a	Rdto
(AcO) ₄ -D-Tal-NH ₂ 28		(AcO) ₄ -D-Tal-Py ^B -NO ₂ (43)	0/1	70%
(AcO) ₄ - α/β -L-Man-NH ₂ 32.a/32.b	42	(AcO) ₄ - α/β -L-Man-Py ^B -NO ₂ (44.a/44.b)	0.15/1	70%
(AcO) ₄ - β -L-Gal-NH ₂ 38		(AcO) ₄ - β -L-Gal-Py ^B -NO ₂ (45)	0/1	65%

^aEsta proporción se determinó por ¹H-RMN en el espectro del crudo de reacción

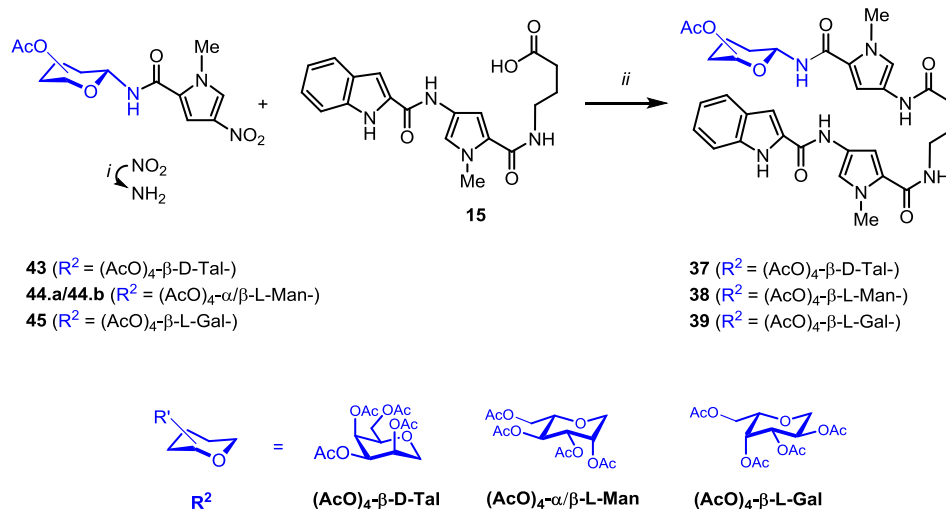
3.3.3. Preparación de los derivados acetilados (AcO)₄- β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**37**), (AcO)₄- β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (**38**) y (AcO)₄- β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**39**) por la Ruta B.

Los compuestos **37-39** se prepararon por la Ruta B: Azúcar-Py^B-NO₂ + HO- γ -Py^A-Ind (**15**). (Esquema 3.19) mediante una secuencia de dos etapas a partir de los glico-nitropirroles **III** (compuestos **43**, **44.a/44.b** y **45**) y del ácido HO- γ -Py-Ind (**15**).

La primera etapa de la secuencia consistió en la reducción de los glico-nitropirroles **43**, **44.a/44.b** y **45**, a sus correspondientes aminas,ⁿ mediante hidrogenación con una corriente de H₂ y empleando Pd/C (5%) como catalizador en CH₂Cl₂. La segunda etapa implica el acoplamiento de las aminas correspondientes y el ácido HO- γ -Py^A-Ind (**15**) empleando PyBOP como reactivo activante en presencia de DIEA y DMF como disolvente.

Los tres derivados **37**, **38** y **39** se obtuvieron con rendimientos comprendidos entre el 38 y 40%. (Ver esquema 3.19 y tabla 3.2).

ⁿ Dichas aminas se usa en la siguiente etapa sin purificación dada su inestabilidad.



Esquema 3.19. Preparación de los compuestos acetilados **37**, **38** y **39** mediante la Ruta B. Condiciones y reactivos: i) H_2 , Pd/C (5%), CH_2Cl_2 , 15h, t.a.; ii) PyBOP, DIEA, DMF, 48 h, t.a.

Tabla 3.2. Preparación de los derivados acetilados **37**, **38** y **39**

Amina III	Ácido	Producto	α/β	Rdto
(AcO) $_4$ - β -D-Tal-Py ^B -NO ₂ 43	15	(AcO) $_4$ - β -D-Tal-Py ^B - γ -Py ^A -Ind (37)	0/1	40%
(AcO) $_4$ - α/β -L-Man-Py ^B -NO ₂ 44.a/44.b		(AcO) $_4$ - β -L-Man-Py ^B - γ -Py ^A -Ind (38)	0/1	38%
(AcO) $_4$ - β -L-Gal-Py ^B -NO ₂ 45		(AcO) $_4$ - β -L-Gal-Py ^B - γ -Py ^A -Ind (39)	0/1	39%

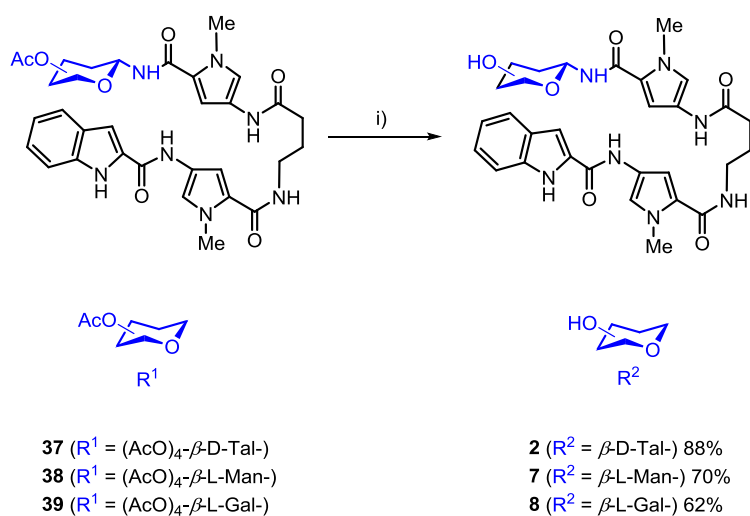
En conclusión, podemos decir que el empleo de la Ruta B ha permitido no sólo la obtención de los derivados **38** y **39**, obtenidos previamente por la Ruta A, sino también la obtención del derivado de talosa (AcO) $_4$ - β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**37**).

Además mediante el empleo de la Ruta B se ha conseguido la obtención del anómero β de los tres derivados acetilados **37-39**. Dicho anómero es el deseado para poder llevar a cabo los estudios estructurales de caracterización de enlaces de hidrógeno cooperativos.

3.3.4. Reacción de desacetilación.

Finalmente, una vez obtenidas las glico-oligoamidas acetiladas, en su configuración β anomérica, se lleva a cabo la desprotección de los grupos acetato de los derivados **(AcO)₄- β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (37)**, **(AcO)₄- β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (38)** y **(AcO)₄- β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (39)**. Esta metodología permite obtener las glico-oligoamidas finales **2**, **7**, y **8** de estructura general **Azúcar-Py^B- γ -Py^A-Ind**.

Las glico-oligoamidas acetiladas se trataron con MeONa en metanol^[36] (Esquema 3.21). Tras neutralización y evaporación del disolvente a presión reducida y sin necesidad de purificación cromatográfica se obtuvieron los compuestos totalmente desacetilados con rendimientos de entre el 62 y el 88%. (Esquema 3.20).



Esquema 3.20. Preparación de los compuestos finales **β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (2)**, **β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (7)** y **β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (8)**. Condiciones y reactivos: MeONa/MeOH, t.a. 30 min.

La reacción de desprotección no conduce a epimerización en la posición anomérica por lo que se obtienen las glico-oligoamidas con configuración β en todos los casos.

Como conclusión, se han obtenido las glico-oligoamidas finales **β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (2)**, **β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (7)** y **β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (8)** mediante la Ruta B.

Todas las glico-oligoamidas resultaron ser solubles en disolución acuosa lo que nos permitirá la realización de los estudios estructurales de cooperatividad de EH y de interacción con ADN en medio fisiológico.

3.3.5. Preparación del modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (6).

Los estudios estructurales y de cooperatividad de EH hicieron necesaria la síntesis de los modelos de hebra azúcar manosa β -D-Man-Py^B-NHAc (5) y talosa β -D-Tal-Py^B-NHAc (6).

Así, los modelos de hebra azúcar^[54] 5 y 6 se han empleado en esta tesis con el fin de ser compuestos modelo para los estudios estructurales tanto de conformación como de caracterización de EHs de las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Tal (2). En la figura 3.9 se muestra la estructura del modelo de hebra azúcar objeto de síntesis en esta tesis.

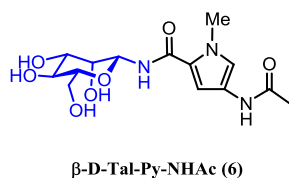
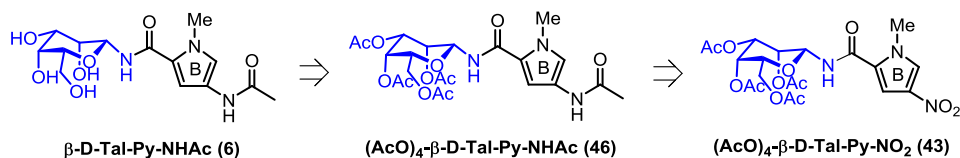


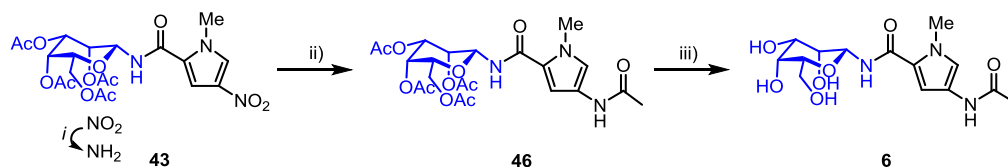
Figura 3.9. Estructura del modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (6)

El esquema 3.21 muestra el esquema retrosintético del modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (6).



Esquema 3.21. Esquema retrosintético para la obtención del modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (6).

Así, el compuesto β -D-Tal-Py^B-NHAc (6) se obtiene a partir del glico-nitropirrol **III** $(\text{AcO})_4$ - β -D-Tal-Py^B-NO₂ (43) mediante la secuencia: reducción del grupo nitro a amina y acetilación de la amina correspondiente. (Esquema 3.22).



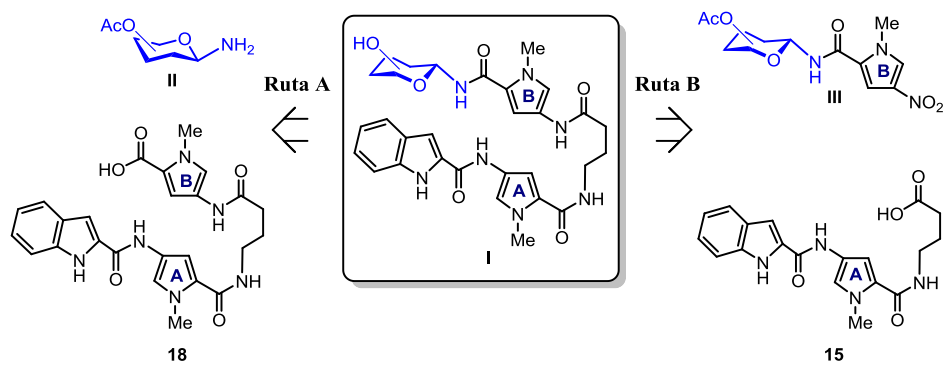
Esquema 3.22. Preparación del compuesto β -D-Tal-Py^B-NHAc (**6**). Condiciones y reactivos: i) H₂, Pd/C, AcOEt/EtOH, 15 h, t.a. ii) Ac₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 18 h, 54% iii) MeONa/MeOH, 30 min, t.a. 83%

Se realizó la reducción del grupo nitro de **43** a la correspondiente amina con corriente de H₂ y Pd/C (5%) en AcOEt/MeOH. Tras filtrado sobre Nylon y eliminación del disolvente, se obtuvo la amina correspondiente empleada sin purificación en la etapa de acetilación. Para la acetilación de la amina se empleó anhídrido acético, Et₃N y CH₂Cl₂ obteniéndose el derivado **46** con un rendimiento del 54%. A continuación el compuesto **46** se desacetila con metóxido sódico en metanol obteniéndose el modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (**6**) con un rendimiento del 83%. (Esquema 3.22).

Como conclusión, el empleo de la Ruta B también ha permitido la síntesis del modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py^B-NHAc (**6**) desde el derivado **43** en una secuencia de 3 etapas con un rendimiento global del 45%. El compuesto **6** ha resultado ser soluble en agua lo que ha permitido llevar a cabo los estudios estructurales de caracterización de EHs en disolución acuosa.

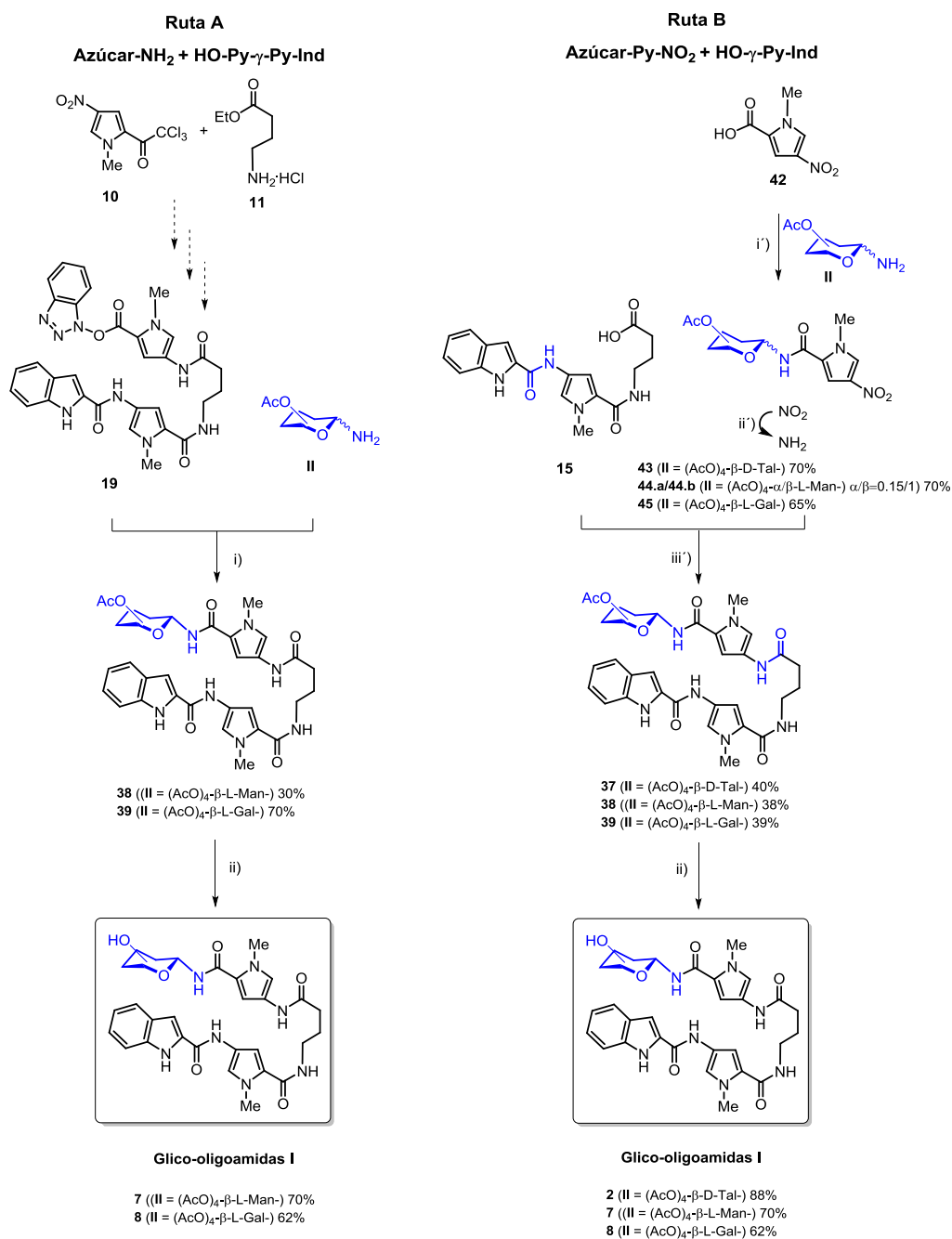
3.4. Comparación de las Rutas A y B para la preparación de las glico-oligoamidas β -D-Tal (**2**), β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**).

Como conclusión, se han sintetizado las glico-oligoamidas β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**) empleando dos rutas sintéticas alternativas utilizadas anteriormente en nuestro grupo de investigación: **Ruta A (ruta lineal)**: Azúcar-NH₂ + HO-Py^B- γ -Py^A-Ind y **Ruta B (ruta convergente)**: Azúcar-Py^B-NO₂ + HO- γ -Py^A-Ind. (Esquema 3.24). El esquema retrosintético para la síntesis de las glico-oligoamidas por las Rutas A y B se muestra a continuación. (Esquema 3.23). La glico-oligoamida β -D-Tal (**2**),^[55] sólo pudo obtenerse mediante el empleo de la Ruta B.



Esquema 3.23. Esquema retrosintético para la síntesis de glico-oligoamidas por las Rutas A y B.

A continuación, se muestra el esquema sintético para la preparación de las glico-oligoamidas β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**) tanto por la Ruta A^[55] como por la Ruta B y la glico-oligoamida β -D-Tal (**2**) por la Ruta B. (Esquema 3.24).



Esquema 3.24. Esquema sintético para la preparación de las glico-oligoamidas **2**, **7** y **8** mediante las **Rutas A** y **B**. Condiciones y reactivos: **Ruta A**: i) DIEA, DMF, 72 h, t.a.; ii) MeONa, MeOH, 30 min, t.a.; **Ruta B**: i') PyBOP, DIEA, DMF, 48 h, t.a. ii') H₂, Pd/C (5%), 15 h, t.a.; iii') PyBOP, DIEA, DMF, 48 h, t.a. ii) MeONa, MeOH, 30 min, t.a.

En conclusión, la Ruta B ha resultado ser la más eficiente para la síntesis de las glico-oligoamidas **2**, **7** y **8**. Esta ruta ha permitido obtener las 3 glico-oligoamidas con un rendimiento global del 10, 8 y 6% para las glico-oligoamidas de **β -D-Tal (2)**, **β -L-Man (7)** y **β -L-Gal (8)**, respectivamente. (Ver tabla 3.3).

Tabla 3.3. Rendimientos globales para la obtención de las glico-oligoamidas **2**, **7** y **8** y el modelo de hebra carbohidrato **6** por las Rutas A y B.

Glico-oligoamida	Ruta A	Ruta B
(HO) ₄ - β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (2)	-	10%
(HO) ₄ - β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (7)	4%	8%
(HO) ₄ - β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (8)	8%	6%
β-D-Tal-Py^B-NHAc (6)	-	17%

En el empleo de la Ruta B las cantidades necesarias en la reacción de acoplamiento entre cada amino azúcar **28**, **32.a /32.b** y **36** y el ácido activado **HO-Py-NO₂ (42)** son estequiométricas mientras que en la Ruta A es necesario un exceso de 2 equivalentes de la glicosilamina correspondiente para que el acoplamiento tenga lugar. Esto supone una ventaja en el caso de la Ruta B sobre la Ruta A desde el punto de vista de la economía de la reacción de acoplamiento especialmente teniendo en cuenta el número de etapas y el coste que supone la obtención de la talosamina (**AcO**)₄- **β -D-Tal-NH₂ (28)**.

En la Ruta A se procedió al aislamiento del éster activado **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (19)** para llevar a cabo la reacción de acoplamiento. Por el contrario, en la Ruta B, todas las reacciones de acoplamiento se han llevado a cabo mediante la activación *in situ* del ácido correspondiente empleando como grupo activante PyBOP. Así, se ha evitado la formación del subproducto DIPU que se genera en el método de las carbodiimidas con DIPC/HOBt y que es difícil de eliminar en el proceso de purificación

Por otro lado, la obtención de los productos no deseados (**AcO**)₃- **β -L-Man-NHAc (40)** y (**AcO**)₃- **α -L-Gal-NHAc (41)**, (Figura 3.7, apartado 3.2.3), en la reacción de acoplamiento al emplear la Ruta A provoca la disminución del rendimiento de la reacción especialmente entre el aminoazúcar (**AcO**)₄- **α / β -L-Man-NH₂ (32.a/32.b)** con el OH-2 en configuración axial y el **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (19)**. Por el contrario, en la Ruta B no se observó

la formación de estos productos no deseados (**40** y **41**) en la reacción de acoplamiento entre las correspondientes glicosilaminas **28**, **32.a** / **32.b** y **36** y el ácido **HO-Py-NO₂** (**42**).

Finalmente, es importante destacar la diferencia de reactividad entre glicosilaminas que contienen el OH-2 en configuración ecuatorial y aquellas cuya configuración es axial en la reacción de acoplamiento en la Ruta A: **Azúcar-NH₂** + **BtO-Py-γ-Py-Ind** (**19**).

3.5. Conclusiones.

- Se ha llevado a cabo una estrategia sintética que ha permitido la obtención de la amina de talosa (**(AcO)₄-β-D-Tal-NH₂** (**28**) a una escala de 0.3 gramos.
- Se han sintetizado las nuevas glico-oligoamidas objeto de estudio de esta tesis **β-L-Man** (**7**) y **β-L-Gal** (**8**) mediante el empleo de dos rutas. La Ruta A (lineal) y Ruta B (convergente). La glico-oligoamida **β-D-Tal** (**2**) sólo se ha conseguido por la Ruta B.
- El empleo de la Ruta B ha permitido la obtención de las tres glico-oligoamidas **β-D-Tal** (**2**), **β-L-Man** (**7**) y **β-L-Gal** (**8**) a una escala de ~ 30 miligramos.
- El empleo de la Ruta B permite la obtención y aislamiento de los derivados acetilados (**(AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind** (**37**), (**(AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind** (**38**) y (**(AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind** (**39**) en su forma anomérica β. Dicha ruta posibilita la obtención de las glico-oligoamidas finales **β-D-Tal** (**2**), **β-L-Man** (**7**) y **β-L-Gal** (**8**) en forma de un único anomero β que es el adecuado para llevar a cabo los estudios estructurales de caracterización de EHs cooperativos.
- El empleo de la **Ruta B** ha permitido también la obtención del modelo de hebra azúcar **β-D-Tal-Py^B-NHAc** (**6**) a escala de ~20 mg, compuesto necesario para los estudios estructurales en medio acuoso.

3.6. Referencias.

- , C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10870-10881.
- [2] Izumori, K. *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 120.
- [3] Muniruzzaman, S.; Pan, Y. T.; Zeng, Y.; Atkins, B.; Izumori, K.; Elbein, A. D. *Glycobiology* **1996**, 6, 795-803.
- [4] Hossain, M. A. W., H.; Goda, F.; Kobayashi, S.; Maeba, T.; Maeta, H. *Transplant. Proc* **2000**, 32, 2021.
- [5] Livesey, G. B., J. C. *J. Nutr* **1996**, 126, 1601.
- [6] Zhang, G.; Zhang, L.; Fang, L.; Zhu, J.; Aimiwu, J.; Shen, H.; Cheng, M.; Muller, G.; Lee, D.; Sun, P.; Wang, G.; Zhang *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5269-5278.
- [7] Bailly, C.; Qu, X.; Graves, D. E.; Prudhomme, M.; Chaires, J. B. *Chemistry & Biology* **1999**, 6, 277-286.
- [8] Gewirtz, D. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 727-741.
- [9] Hecht, S.; Hecht *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 158-168.
- [10] (a) Czechura, P.; Tam, R. Y.; Dimitrijevic, E.; Murphy, A. V.; Ben, R. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2928-2929; (b) Öberg, C. T.; Blanchard, H.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3691-3694; (c) Jachymek, W.; Niedziela, T.; Petersson, C.; Lugowski, C.; Czaja, J.; Kenne, L. *Biochemistry* **1999**, 38, 11788-11795.
- [11] (a) Lerner, L. M.; Mennitt, G. *Carbohydr. Res.* **1994**, 259, 191-200; (b) Sznajdman, M. L.; Hecht, S. M. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2811-2814; (c) Strong, J. E.; Crooke, S. T. *Cancer Research* **1978**, 38, 3322-3326.
- [12] (a) Linington, R. G.; Robertson, M.; Gauthier, A.; Finlay, B. B.; van Soest, R.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2002**, 4, 4089-4092; (b) De Castro, C.; Gargiulo, V.; Lanzetta, R.; Parrilli, M. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1047-1051.
- [13] (a) Schüssler, H.; Zahn, H. *Chem. Ber.* **1962**, 95, 1076; (b) Krowicki, K.; Lown, J. W. *J. Org. Chem* **1987**, 52, 3493-3501; (c) Harris, J. M.; Keränen, M. D.; Nguyen, H.; Young, V. G.; O'Doherty, G. A. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 17-36; (d) Ko, S. Y. L., A.W.M.; Masamune, S.; Reed, L.A.; Sharpless, K.B.; Walker, F.J. *Science* **1983**, 220, 949-951; (e) Harris, J. M.; Keränen, M. D.; O'Doherty, G. A. *J. Org. Chem* **1999**, 64, 2982-2983; (f) O'Doherty, G. A. A., M.M. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10576-10578; (g) Green, A. *Aust. J. Chem.* **2002**, 55, 95-103; (h) Xiao, H.; Wang, G.; Wang, P.; Li, Y. *Chin. J. Chem.* **2010**, 28, 1229-1232; (i) Kopitzki, S.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 4008-4016; (j) Baer, H. H. *J. Am. Chem. Soc* **1962**, 84, 83-89; (k) Haukaas, M. H. O. D., G.A. *Org. Lett.* **2001**, 3, 3899-3902.
- [14] Hodosi, G.; Kováč, P. *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, 17, 557-565.
- [15] Knapp, S.; Knapp, P. J.; Kukkola, S.; Sharma, T. G. M.; Dhar, A. B. J.; Naughton, S. J. *Org. Chem.* **1990**, 55, 5700-5710.
- [16] Zulueta, M. M. L.; Zhong, Y.-Q.; Hung, S.-C.; Zulueta, M. *Chemical communications (London. 1996)* **2013**, 49, 3275.
- [17] Claussen, C.; Claussen, E. C.; Long, C. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2797-2816.
- [18] Mangion, I.; Mangion, D. W. C.; MacMillan, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3696-3697.
- [19] Yamazaki, M. T., L.; Mikolajczak, M.; Armentrout, R.W.; Pollock, T.J. *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 2676-2687.
- [20] Ridley, B. L. O. N., M.A.; Mohnen, D. *Phytochemistry* **2001**, 57, 929-967.
- [21] Gutierrez, M. C., T.; Guzman, H.M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7833-7836.
- [22] Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Baráth, M.; Broberg, K. R.; Avizienyte, E.; Helliwell, M.; Raftery, J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 7823-7843.

- [23] (a) Babu, R. S.; O'Doherty, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12406-12407; (b) Northrup, A. B.; MacMillan, D. W. C. *Science* **2004**, *305*, 1752-1755; (c) Ermolenko, L.; Sasaki, N. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 693-703.
- [24] (a) Oshitari, T.; Shibasaki, M.; Yoshizawa, T.; Tomita, M.; Takao, K.-i.; Kobayashi, S. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10993-11006; (b) Takahashi, H.; Hitomi, Y.; Iwai, Y.; Ikegami, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2995-3000.
- [25] Dulaney, S.; Dulaney, X.; Huang, S. *Strategies in Synthesis of Heparin/Heparan Sulfate Oligosaccharides*
- Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2012; Vol. 67.
- [26] Cai, X.; Zong, G.; Xu, Y.; Zhang, J.; Liang, X.; Wang, D. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1230-1234.
- [27] Yu, H. N.; Furukawa, J.-i.; Ikeda, T.; Wong, C.-H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 723-726.
- [28] (a) Chenoweth, D. M.; Harki, D. A.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7175-7181; (b) Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983-7988; (c) Tao, Z.-F.; Fujiwara, T.; Saito, I.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4961-4967; (d) Grehn, L.; Ragnarsson, U. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3492-3497; (e) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [29] (a) Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141-6146; (b) Wurtz, N. R.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1201-1203.
- [30] (a) Bialer, M. Y., B.; Mechoulam, R. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2389-2391; (b) Lown, J. W.; Krowicki, K. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 3774-3779.
- [31] El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.
- [32] Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3325-3332.
- [33] König, B. *Chem. Commun.* **1998**, 605-606.
- [34] Simons, J. P.; Davis, B. G.; Cocinero, E. J.; Gamblin, D. P.; Stanca-Kaposta, E. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 718-722.
- [35] Martin, J. N.; Munoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Canada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518-9533.
- [36] Hong, F.; Fan, E. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6073-6076.
- [37] Número CAS: 10030-80-5; Catálogo Alfa-Aesar; 2013, Ref:A17722-1g, 111.0 euros.
- [38] Número CAS: 15572-79-9; Catálogo Alfa-Aesar; 2013, Ref:B21448-500mg, 327 euros.
- [39] Vicente, V.; Martin, J.; Jiménez-Barbero, J.; Chiara, J. L.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4240-4251.
- [40] Número CAS: 59-23-4; Catálogo Adrich; 2010, R. G.-g., 42.60 euros.
- [41] Bhattacharjee, A. K.; Zissis, E.; Glaudemans, C. P. J. *Carbohydr. Res.* **1981**, *89*, 249-254.
- [42] Hodosi, G.; Kováč, P. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 239-243.
- [43] Pfeffer, P. E.; Valentine, K. M.; Parrish, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1265-1274.
- [44] Banwell, M. G. E., A. J.; Lambert, J. N.; Ma, X. H.; Watson, K. G. *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 95-103.
- [45] Gelas, J.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 103-121.
- [46] Matsubara, K. M., T. *Chem. Lett.* **1994**, 247.
- [47] Rao, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1993**, 1207.
- [48] Robyt, J. F. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*; Ed. Springer, 1998.
- [49] IUPAC-IUB, J. C. o. B. N. J. *Eur. J. Biochem* **1980**, *111*, 295-298.
- [50] Dra. Concepción Badía Tortosa, Tesis Doctoral. "Síntesis de sustratos del surco menor del ADN con estructura tipo Glico-Oligoamida". Universidad Autónoma de Madrid. Enero 2011.
- [51] (a) Deulofeu, V.; Deferrari, J. O. *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1087-1092; (b) Deulofeu, V. *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1097; (c) Deulofeu, V. *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1093.

- [52] Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Evin, G.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [53] Otsuka, M.; Masuda, T.; Haupt, A.; Ohno, M.; Shiraki, T.; Sugiura, Y.; Maeda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838-845.
- [54] numeración, V. a. d. n. y.
- [55] *El rendimiento para la obtención de la glico-oligoamida de Talosa 2 mediante la Ruta A ha sido calculado como rendimiento global de las dos etapas finales (acoplamiento y reducción).*

4. CARACTERIZACIÓN DE ENLACES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN GLICO-OLIGOAMIDAS β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1) Y β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2) EN DISOLUCIÓN ACUOSA POR RMN.

Como se explicó anteriormente, el proyecto donde se enmarca el objetivo de esta tesis es el estudio de redes de EH intramoleculares en agua y su participación en procesos de reconocimiento molecular carbohidrato-ADN.

Para ello, se ha diseñado una estrategia general de creación de centros dadores de EH cooperativos mediante la caracterización de motivos de EHs intramoleculares y direccionales que podrían sobrevivir en medio acuoso. (Ver esquema general de la figura 4.1).

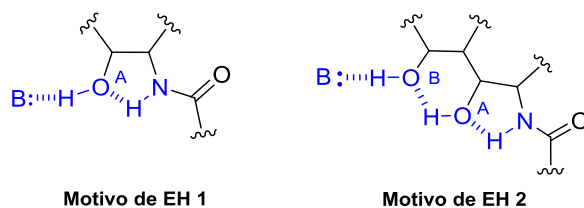


Figura 4.1. Motivos estructurales de EH 1 (de 5 miembros) y de EH 2, (de 5 y 6 miembros) respectivamente que dan lugar a la generación de OH_A y OH_B como centros dadores de EH cooperativos.

El primer diseño (Figura 4.1, izquierda), muestra un EH intramolecular en un ciclo de 5 miembros entre el NH amido, (siendo sólo donador de EH), y OH_A , comportándose el NH como iniciador de una red de EH direccional. En esta situación OH_A es un aceptor de la amida y a la vez podría comportarse como un donador cooperativo en un proceso intermolecular con un aceptor externo. Esta red de EH puede extenderse a OH_B , (figura 4.1, derecha), si OH_A establece un fuerte y direccional EH intramolecular en un ciclo de 6 miembros. Así, si ambos EH direccionales pueden ser establecidos, entonces, OH_B podría comportarse como un donador cooperativo en un proceso intermolecular con un aceptor externo.

Esta estrategia general ha sido aplicada en particular a determinadas glico-oligoamidas, ligandos del surco menor del ADN.

Se han elegido las glico-oligoamidas de manosa β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1) y de talosa β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (2) (Figura 4.2) que, de acuerdo a nuestro diseño, podrían presentar un EH intramolecular direccional entre el NH de amida, de la posición anomérica, y el OH-2 en configuración axial del azúcar. Dicha configuración, posibilita la generación de un

EH intramolecular en un ciclo de 5 miembros (ec, ax) $\text{NH}\cdots\text{OH}\cdots\text{H}_2\text{O}$ en la glico-oligoamida **β -D-Man (1)** siendo el NH un donador y el OH-2 un aceptor de EH. El OH-2 podría comportarse como un centro donador de EH cooperativo en procesos de reconocimiento molecular futuros. Esta red de EH puede extenderse a OH-4 en **β -D-Tal (2)**, si OH-2 establece un EH intramolecular fuerte y direccional en un ciclo de 6 miembros (ax, ax). De este modo, si se establecen ambos EHs direccionales en **β -D-Tal (2)**, se generaría una red de EH intramolecular $\text{NH}\cdots\text{OH}\cdots\text{OH}\cdots\text{H}_2\text{O}$ donde OH-4 podría comportarse como un donador de EH cooperativo en un proceso intermolecular con un aceptor externo.

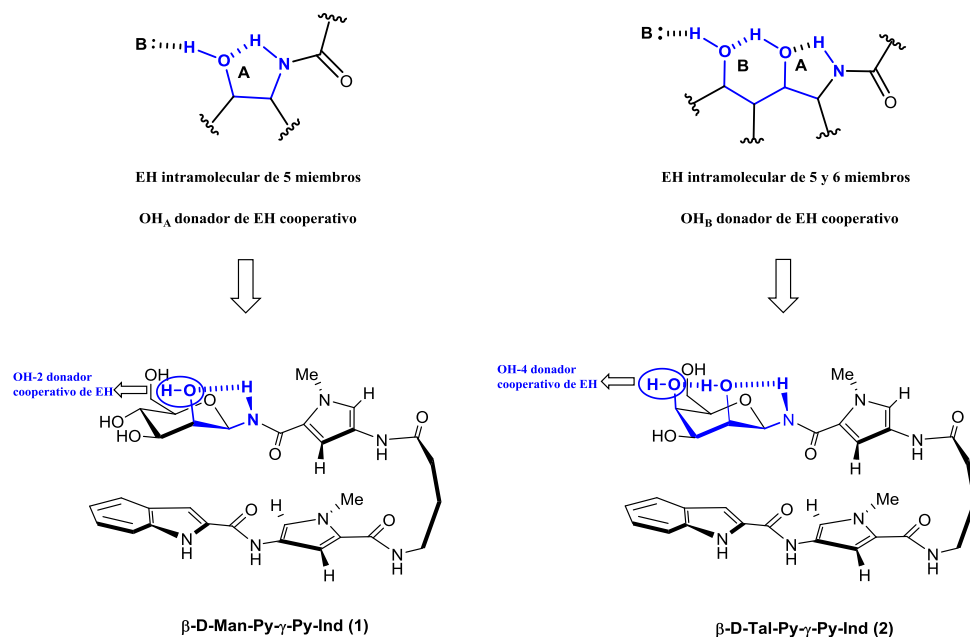


Figura 4.2 Representación de la estrategia particular de generación de centros dadores de EH en las glico-oligoamidas de manosa y talosa.

Para realizar los estudios de caracterización de EH intramoleculares en disolución acuosa, se han empleado, por motivos comparativos, oligoamidas modelo de glucosa **β -D-Glc-Py- γ -Py-Ind (3)**, **β -D-Glc (3)**, y de galactosa, **β -D-Gal-Py- γ -Py-Ind (4)**, **β -D-Gal (4)** (Figura 4.3), con el OH-2 en configuración ecuatorial. Dicha configuración, impide la generación del motivo estructural más estable de EH de 5 miembros (ec, ax). Así, se espera que OH-2 en **β -D-Glc (3)** y OH-4 en **β -D-Gal (4)** sean centros dadores de EH no cooperativos.

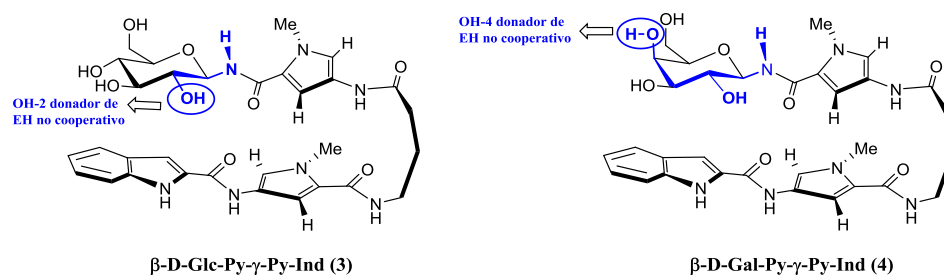


Figura 4.3 Representación de los centros dadores de EH en las glico-oligoamidas de β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4).

Por otro lado, para conocer la influencia de la región aromática -Py-Ind de las glico-oligoamidas sobre el fragmento de azúcar de los ligandos de ADN, pero manteniendo el patrón de EH intramolecular, se sintetizaron los modelos de hebra carbohidrato de las glico-oligoamidas **1** y **2**, β -D-Man-Py-NHAc (**5**) y β -D-Tal-Py-NHAc (**6**) con centros dadores de EH cooperativos.

Previo a los estudios de caracterización de EH intramoleculares, y debido a que el NH amídico de la posición anomérica del carbohidrato, además de participar en la red de EH intramolecular, está involucrado en el fragmento -Py- γ -Py-Ind, hemos creído conveniente incluir, en primer lugar en este capítulo, los estudios estructurales que determinan la conformación tanto de glico-oligoamidas que poseen el OH-2 en configuración axial, β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (**1**) y β -D-Tal-Py- γ -Py-Ind (**2**), como de aquellas cuyo OH-2 está en configuración ecuatorial β -D-Glc-Py- γ -Py-Ind (**3**) y β -D-Gal-Py- γ -Py-Ind (**4**).

4.1. Estudios conformacionales para la determinación de la estructura en horquilla de las glico-oligoamidas β -D-Man (**1**), β -D-Tal (**2**), β -D-Glc (**3**) y β -D-Gal (**4**).

El conocimiento de la estructura y la dinámica de los ligandos en el estado libre en disolución acuosa juega un papel importante en procesos de reconocimiento molecular. En los casos en que el ligando es flexible en disolución, la pérdida de grados de libertad que implica el proceso de asociación constituye una de las mayores contribuciones entrópicas que desfavorecen dicho proceso.^[1] Por ello, una posible estrategia en el diseño de ligandos eficaces consiste en bloquear el ligando en su conformación bioactiva.^[2]

Los estudios conformacionales de las glico-oligoamidas **1-4**, que se presentan en esta tesis, han sido llevados a cabo mediante RMN en H₂O a -15 °C para la detección de las resonancias de los protones intercambiables de los grupos hidroxilo y NH amídico. Para el

estudio conformacional de los ligandos se han realizado experimentos NOESY, se han evaluado los desplazamientos químicos tanto con experimentos de temperatura variable como por comparación con los modelos de hebra azúcar **5** y **6** y, además, se han medido las constantes de acoplamiento escalares para estudiar el grado de movilidad alrededor del enlace amido-glicosídico. Todos estos estudios han sido apoyados por cálculos teóricos de mecánica y dinámica molecular y *ab initio* en el apartado 4.3.

4.1.1. Asignación de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4) en H₂O a baja temperatura.

Previo al estudio conformacional se asignaron todas las resonancias de los espectros de protón de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** en H₂O a -15 °C. (Ver figura 4.3).

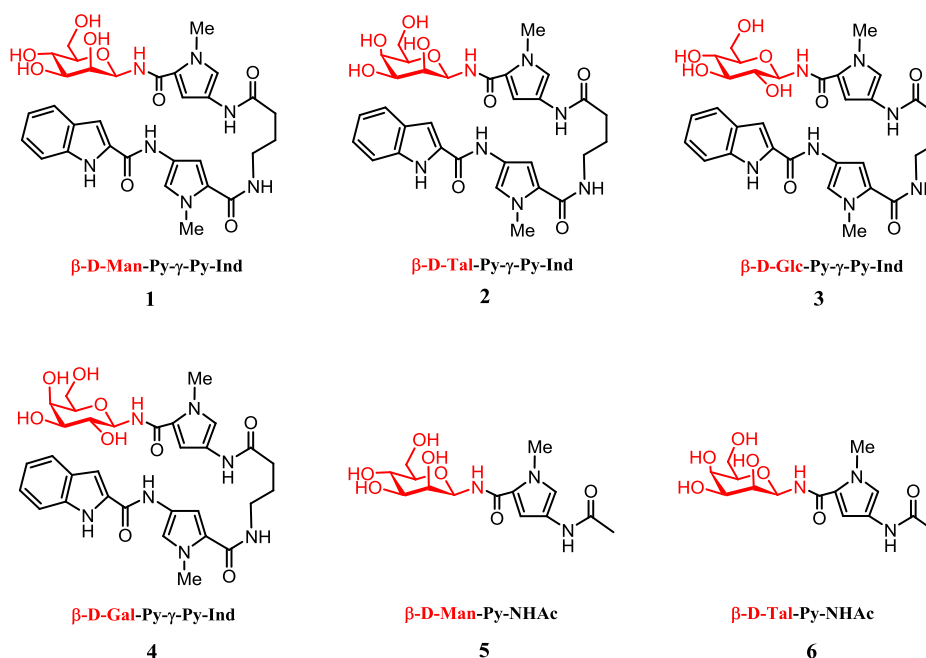


Figura 4.3 Representación de las moléculas objeto de estudio **1-6**.

Los experimentos bidimensionales realizado en D₂O a 25 °C, (COSY, TOCSY (60-80ms), HSQC-editado, HMBC, NOESY (200-400ms), ROESY (200ms), resultaron de gran ayuda para la asignación a -15 °C.

La detección y asignación de las resonancias de los protones hidroxilo y amídicos intercambiables de los compuestos **1-6** se realizó mediante espectros de RMN TOCSY (60 ms) y NOESY (400ms) en una mezcla de H₂O/Acetona-d₆, 90:10, a -15 °C.

De manera general se pudieron distinguir cuatro regiones espectrales en los espectros de ¹H-RMN de los compuestos **1-4** en H₂O/Acetona-d₆, 90:10, a 258K como se observa en la figura. (Figura 4.4).

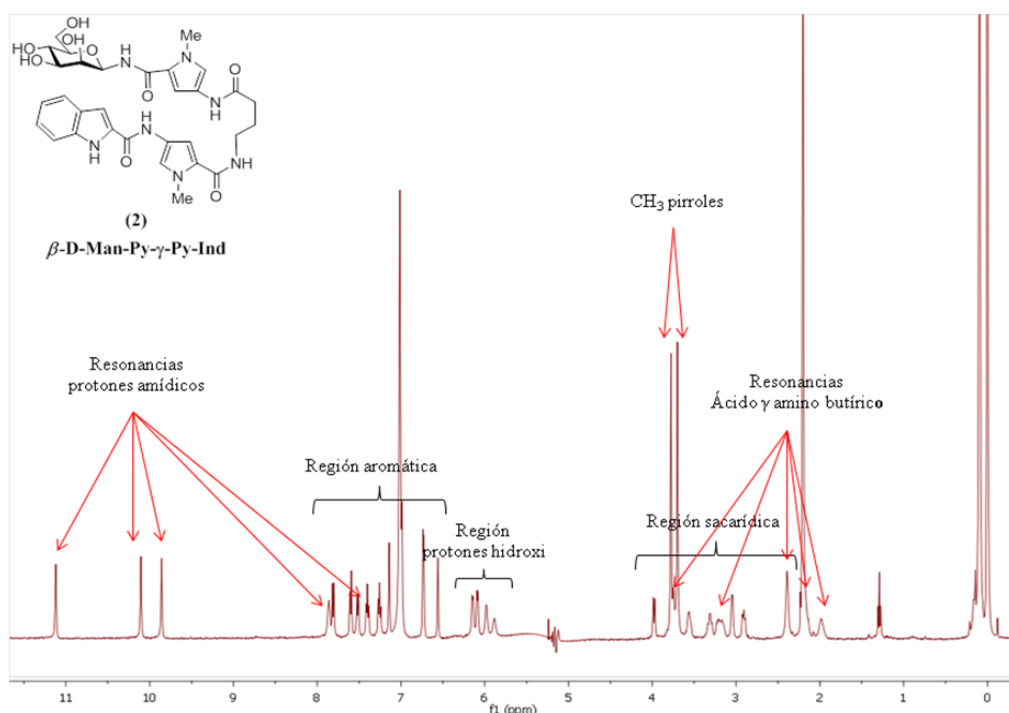
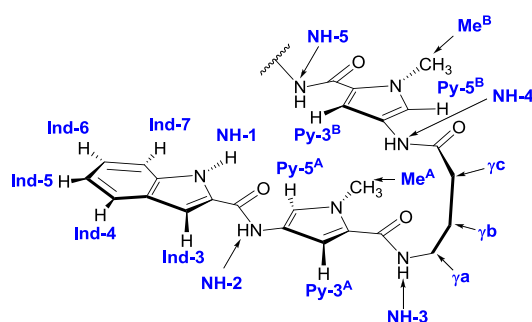
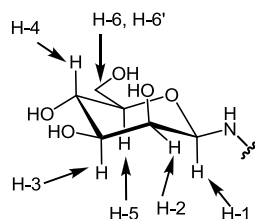


Figura 4.4. Regiones espectrales características de las glico-oligoamidas sintetizadas.

La nomenclatura utilizada para designar las resonancias de los protones del fragmento de la molécula vector **-Py- γ -Py-Ind** es la siguiente:



Para designar las resonancias de los protones del carbohidrato se utilizó la nomenclatura IUPAC correspondiente al anillo de piranosa.



A continuación se muestran las tablas con los desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de todas las resonancias de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** en una mezcla H₂O/Acetona-d₆, 90:10 a -15 °C.

Tabla 4.1 Desplazamiento químico (ppm \pm 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones aromáticos y del residuo de ácido γ -aminobutírico en el espectro de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas **1-4** en H₂O/Acetona-d₆ (90:10) a -15 °C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

		β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)
Concentración		10^{-4} M			
Indol	In-3	7.14 (s)	7.11 (s)	7.20 (s)	7.17 (s)
	In-4	7.81 (d, $J = 8.59$)	7.78 (d, $J = 8.54$)	7.77 (d, $J = 8.52$)	7.76 (d, $J = 8.90$)
	In-5	7.26 (t, $J = 7.75$)	7.23 (t, $J = 7.71$)	7.21 (t, $J = 8.21$)	7.20 (t, $J = 7.80$)
	In-6	7.40 (t, $J = 7.66$)	7.37 (t, $J = 7.68$)	7.36 (t, $J = 7.80$)	7.36 (t, $J = 7.71$)
	In-7	7.60 (d, $J = 8.47$)	7.58 (d, $J = 8.46$)	7.56 (t, $J = 7.56$)	7.56 (d, $J = 8.60$)
Pirroles	Py-3 ^A	6.56 (s)	6.53 (s)	6.57 (s)	6.54 (s)
	Py-3 ^B	6.73 (s)	6.73 (s)	6.69 (s)	6.71 (s)
	Py-5 ^A	6.99 (s)	6.99 (s)	7.12 (s)	7.13 (s)
	Py-5 ^B	6.74 (s)	6.75 (s)	6.89 (s)	6.89 (s)
	Me ^A	3.77 (s)	3.74 (s)	3.74 (s)	3.73 (s)
	Me ^B	3.70 (s)	3.68 (s)	3.61 (s)	3.60 (s)
Cadena γ	γ a	3.75 (sa)	3.60 - 3.66 (m)	3.45 - 3.50 (m)	3.50 - 3.47 (m)
	γ a'	3.17 - 3.19 (m)	3.15 - 3.17 (m)	3.40 - 3.43 (m)	3.36 (s)
	γ b	2.20 (sa)	2.13 - 2.15 (m)	2.06 - 2.01 (m)	2.00 - 2.04 (m)
	γ b'	1.98 (sa)	1.96 - 1.98 (m)	a	a
	γ c	2.39 (sa)	2.38 (sa)	2.42 (t, $J = 6.02$)	2.41 (t, $J = 6.06$)

a) Para los protones metilénicos de β -D-Glc (3) y β -D-Glc (4) se observa una única señal a un único valor de desplazamiento químico.

Tabla 4.2 Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones del carbohidrato en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-4** en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a -15°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-D-Glc (3)}$	$\beta\text{-D-Gal (4)}$
Concentración		10^{-4} M			
Carbohidrato	H-1	3.98 (d, $J = 8.83$)	3.94 (d, $J = 9.27$)	4.77 (t, $J = 8.90$)	4.67 (t, $J = 9.67$)
	H-2	3.05 (sa)	3.00 (d, $J = 5.75$)	3.50 - 3.45 (m)	3.70 (sa)
	H-3	2.20 (sa)	2.26 (s)	3.33 (m)	3.53 (m)
	H-4	3.31 (m)	3.54 (s)	3.43 - 3.40 (m)	3.91(sa)
	H-5	2.91 (m)	3.16 (m)	3.33 (m)	3.57 (m)
	H-6	3.75 (sa)	3.60 - 3.66 (m)	3.83 - 3.76 (m)	3.70 (sa)
	H-6'	3.56 (m)	3.60 - 3.66 (m)	3.67 - 3.64 (m)	3.70 (sa)

Tabla 4.3 Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones intercambiables NH's y OH's en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-4** en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a -15°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-D-Glc (3)}$	$\beta\text{-D-Gal (4)}$
Concentración		10^{-4} M			
Protones NH	NH-1	11.12 (s)	11.08 (s)	11.04 (s)	11.02 (s)
	NH-2	10.10 (s)	10.06 (s)	10.18 (s)	10.16 (s)
	NH-3	7.85 - 7.87 (m)	7.81 - 7.83 (m)	7.89 - 7.90 (m)	7.85 - 7.87 (m)
	NH-4	9.86 (s)	9.84 (s)	9.89 (s)	9.89 (s)
	NH-5	7.52 (d, $J = 8.9$)	7.62 (d, $J = 8.9$)	8.56 (t, $J = 8.9$)	8.63 (t, $J = 8.9$)
Protones OH	OH-2	6.08 (d, $J = 6.4$)	5.27	6.45 (sa)	6.32 (sa)
	OH-3	5.98 (sa)	6.13 (sa)	6.40 (sa)	6.24 (sa)
	OH-4	6.14 (sa)	5.26	6.61 (sa)	6.07 (sa)
	OH-6	5.88 (sa)	6.05 (sa)	5.94 (sa)	6.07 (sa)

Tabla 4.4 Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y contantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones de ^1H -RMN de los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a - 15 °C. Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

		$\beta\text{-D-Man-Py-NHAc}$ (5)	$\beta\text{-D-Tal-Py-NHAc}$ (6)
Concentración		10^{-4} M	
NHs	NH-4	10.01 (s)	10.01 (s)
	NH-5	8.18 (d, $J = 8.6$)	8.25 (d, $J = 8.6$)
OHs	OH-2	6.36 (m)	5.54 (s)
	OH-3	6.36 (m)	5.47 (s)
	OH-4	6.42 (d, $J = 7.10$)	6.46 (s)
	OH-6	6.02 (sa)	6.14 (s)
Pirroles	Py-3 ^B	6.84 (s)	6.86 (s)
	Py-5 ^B	7.19 (s)	7.21 (s)
	Me ^B	3.82 (s)	3.83 (s)
	CH ₃	2.11 (s)	2.11 (s)
Carbohidrato	H-1	5.36 (sa)	5.51 (sa)
	H-2	4.04 (sa)	3.97 (sa)
	H-3	3.76 (sa)	3.95 (sa)
	H-4	3.62 - 3.65 (m)	3.91 (sa)
	H-5	3.52 - 3.54 (m)	
	H-6	3.93 - 3.95 (m)	3.80 (sa)
	H-6'	3.76 (sa)	

4.1.2. Determinación de la estructura en horquilla de las glico-oligoamidas $\beta\text{-D-Man}$ (**1**), $\beta\text{-D-Tal}$ (**2**), $\beta\text{-D-Glc}$ (**3**) y $\beta\text{-D-Gal}$ (**4**) mediante RMN: estudio de nOes y de los desplazamientos químicos.

La conformación plegada en horquilla bioactiva de las glico-oligoamidas **1-4** viene determinada por nOes inter-hebra encontrados entre las unidades de pirrol y entre el carbohidrato y el indol de las glico-oligoamidas. (Figura 4.5). Los experimentos NOESY, ($\tau = 400\text{ms}$, 500MHz), fueron realizados en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a - 15 °C y a una concentración 10^{-4} M en todos los casos. En la figura a continuación se representan los nOes interhebra encontrados para cada glico-oligoamida, (figura 4.5). La ampliación de la región espectral concreta para esos nOes se muestra en la figuras 9.1, 9.2, 9.3 y 9.4 del Anexo 9.

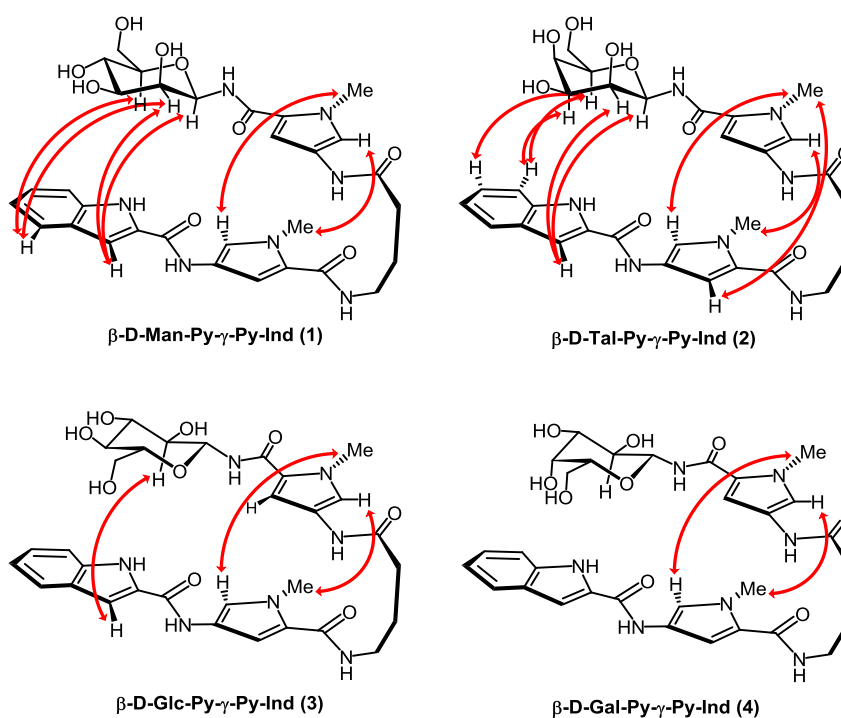


Figura 4.5. Representación esquemática de los nOes inter-hebra encontrados en los espectros NOESY para las glico-oligoamidas **1-4** en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a 258K. (nOes débiles en verde y medios en rojo).

La observación de dichos nOes constituye una prueba inequívoca de la presencia de un cierto porcentaje de conformación en horquilla en disolución acuosa, análoga tanto a la conformación plegada descrita anteriormente para otras glico-oligoamidas en nuestro grupo^[3] y miméticos de factores de transcripción,^[4] como a la conformación bioactiva descrita por Wemmer y colaboradores para sus oligoamidas heteroaromática de estructura más compleja.^[5]

Como puede observarse, los nOes encontrados que caracterizan la estructura en horquilla definen mejor dicha estructura en los derivados de manosa (**1**) y talosa (**2**). Así estos resultados pueden estar relacionados con la existencia de interacciones CH- π carbohidrato-indol y, consecuentemente, con la estabilidad de la estructura plegada. Se encontró un mayor número de nOes para los derivados de manosa (**1**) y talosa (**2**) sugiriendo la existencia de una orientación determinada entre el anillo de azúcar y el indol. Así, estos datos de nOe apuntan a una clara cercanía entre la **cara α del carbohidrato** y el indol en los casos de **β -D-Man (**1**)** y **β -D-Tal (**2**)**, como se muestra en la figura 4.5 y en la tabla 4.5.

Sin embargo, se observó un nOe H-2/Ind-3 en uno de los derivados con el OH-2 en configuración ecuatorial, derivado **3**, indicando la cercanía de la **cara β del carbohidrato** al indol. (Ver figura 4.5 y tabla 4.5).

Así, en la tabla a continuación se resumen todos los nOes inter-hebra encontrados en las glico-oligoamidas **1-4**.

Tabla 4.5. Resumen de nOes inter-hebra pirrol/pirrol y carbohidrato/indol encontrados en los espectros NOESY de las glico-oligoamidas **1-4** en H₂O/Acetona-d₆ (90:10) a 258K.

	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)
nOes pirrol/pirrol	Py-5 ^A /CH ₃ ^B CH ₃ ^A /Py-5 ^B	Py-5 ^A /CH ₃ ^B CH ₃ ^A /Py-5 ^B Py-3 ^A /CH ₃ ^B	Py-5 ^A /CH ₃ ^B CH ₃ ^A /Py-5 ^B	Py-5 ^A /CH ₃ ^B CH ₃ ^A /Py-5 ^B
nOes carbohidrato/indol	H-1/Ind-3 H-2/Ind-3 H-2/Ind-4 H-5/Ind-4	H-1/Ind-3 H-2/Ind-3 H-3/Ind-7 H-5/Ind-7 H-5/Ind-6	H-2/Ind-3	

Para el estudio conformacional de las glico-oligoamidas uno de los métodos que puso de manifiesto el plegamiento de las mismas consistió en estudiar el efecto de la temperatura en los desplazamientos químicos de su espectro de ¹H-RMN.^[6] Este análisis permite obtener, en algunos casos, la estimación de la población de conformación plegada en disolución.

Así, realizamos experimentos de temperatura variable de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** por RMN en H₂O/Acetona-d₆, 90:10, (10⁻⁴ M) cubriendo un rango de temperatura entre -15 °C y 0 °C. No se trabajó a temperaturas superiores a 0 °C debido a la imposibilidad de detectar las resonancias de los protones hidroxilo intercambiables. Los $\Delta\delta$ más significativos encontrados correspondieron al apantallamiento de las resonancias de los protones del carbohidrato H-1 (0.22 y 0.18 ppm), H-2 (0.17 y 0.14 ppm) y H-3 (0.28 y 0.25 ppm) de las glico-oligoamidas **1** y **2** respectivamente. (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 $\Delta\delta$ observados de los protones sacarídicos de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** al descender la temperatura en H₂O/Acetona-d₆ (90:10) a una concentración de 10⁻⁴ M. $\Delta\delta = (\delta_{273K}) - (\delta_{258K})$.

		β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)	β -D-Man-Py-NHAc (5)	β -D-Tal-Py-NHAc (6)
Señal		$\Delta\delta$ (ppm)					
Carbohidrato	H-1	0.22	0.18	0.08	0.08	-	-
	H-2	0.17	0.14	0.03	0.03	0.00	0.00
	H-3	0.28	0.25	0.04	0.05	0.00	0.00
	H-4	0.06	0.07	0.03	0.03	0.00	0.01
	H-5	0.09	0.06	0.04	0.02	0.00	0.00
	H-6	0.02	0.02	0.03	0.01	0.00	0.00
	H-6'	0.03	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00

Sin embargo, no se detectaron cambios significativos para las glico-oligoamidas **3** y **4**. (Tabla 4.6). Este hecho apoya, de nuevo, la existencia de una clara preferencia de la cara α del azúcar por el indol en glico-oligoamidas que poseen el hidroxilo 2 en posición axial. (Figura 4.5).

Además, se han empleado los modelos de hebra carbohidrato, β -D-Man-Py-NHAc (**5**) y β -D-Tal-Py-NHAc (**6**) para la comparación de las diferencias de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) en los espectros de ¹H-RMN entre éstos y sus correspondientes glico-oligoamidas, β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**) al variar la temperatura. Así, pudo observarse que los desplazamientos químicos δ de las resonancias de los modelos **5** y **6** no variaban con la temperatura. (Ver tabla 4.6). De esta manera se ha puesto de manifiesto la presencia de un porcentaje importante de conformación en horquilla de las glico-oligoamidas **1** y **2** en disolución acuosa a baja temperatura. En la figura 4.7 se muestra el equilibrio conformacional entre la forma plegada y abierta de la glico-oligoamida de manosa **1**.

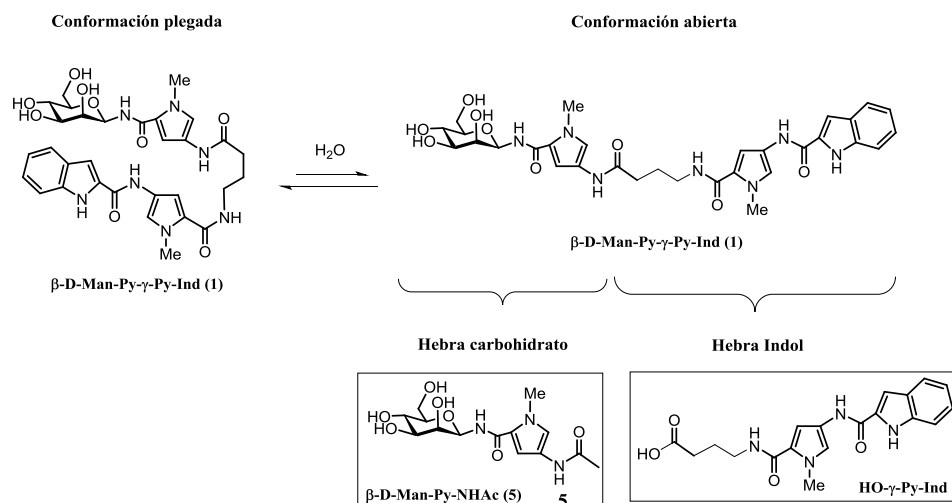


Figura 4.6 Equilibrio conformacional entre la forma plegada y abierta de la glico-oligoamida **β-D-Man-Py-γ-Py-Ind (1)** con el modelo de conformación extendida: hebra carbohidrato **β-D-Man-Py-NHAc (5)** y hebra indol **HO-γ-Py-Ind**.

La presencia de un porcentaje importante de conformación plegada en disolución debería reflejarse en una diferencia de desplazamiento químico notable entre las resonancias de las glico-oligoamidas y las resonancias de los protones de los modelos de hebra carbohidrato.

Así se ha estudiado la diferencia de desplazamiento químico entre las glico-oligoamidas **1** y **2** y sus modelos de hebra carbohidrato **5** y **6**.

Para ello se registraron espectros de 1H -RMN en H_2O /Acetona- d_6 (90:10) en las mismas condiciones de concentración y temperatura (10^{-4} M, - 15 °C). En los espectros de 1H -RMN de las glico-oligoamidas en H_2O a - 15 °C no se observó desdoblamiento de señales en ninguna de las resonancias. Esto quiere decir que existe un equilibrio conformacional rápido en disolución en la escala de tiempos de los desplazamientos químicos (δ). De forma que, los valores de desplazamiento químico (δ) observados son un promedio entre los desplazamientos químicos (δ) característicos de cada conformación y dependen de la población de cada conformero presente en disolución.

A continuación se muestran los desplazamientos químicos de las glico-oligoamidas **β-D-Man (1)**, **β-D-Tal (2)** y sus modelos de hebra carbohidrato **β-D-Man-Py-NHAc (5)**, **β-D-Tal-Py-NHAc (6)** así como la diferencia de desplazamientos químicos entre las glico-oligoamidas y los modelos de hebra carbohidrato correspondientes. (Tabla 4.7).

Tabla 4.7 δ observados de las glico-oligoamidas **1**, **2** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** y $\Delta\delta$ observados entre las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas **1** y **2** y sus respectivos modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** a 258K.

Señal	δ (ppm)				$\Delta\delta$ (ppm)	
	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Man-Py-NHAc (5)	β -D-Tal-Py-NHAc (6)	(1) - (5)	(2) - (6)
NH-4	9.86	9.84	10.01	10.01	-0.15	-0.17
NH-5	7.52	7.62	8.18	8.25	-0.66	-0.63
Py-5 ^B	6.74	6.75	7.19	7.20	-0.45	-0.45
Py-3 ^B	6.73	6.73	6.84	6.86	-0.11	-0.13
OH-4	6.14	5.26	6.41	6.46	-0.27	-1.20
OH-2	6.08	5.27	6.36	5.54	-0.28	-0.27
OH-3	5.98	6.13	6.36	5.47	-0.38	+0.66
OH-6	5.88	6.05	6.02	6.14	-0.13	-0.09
H-1	3.98	3.94	5.36	5.51	-1.38	-1.57
Me ^B	3.70	3.68	3.83	3.83	-0.13	-0.15
H-2	3.05	3.00	4.04	3.97	-0.99	-0.97
H-3	2.20	2.26	3.76	3.95	-1.56	-1.69
H-4	3.31	3.54	3.64	3.91	-0.33	-0.37
H-5	2.91	3.16	3.53	3.80	-0.62	-0.64
H-6	3.75	3.63	3.94	3.80	-0.19	-0.17
H-6'	3.56	3.63	3.76	3.80	-0.2	-0.17

Como puede observarse en la tabla 4.7 se obtuvieron desplazamientos a campo alto muy grandes en las resonancias de todos los protones presentes de la cara α del carbohidrato en las glico-oligoamidas de manosa **1** y talosa **2** respecto de las resonancias observadas de los compuestos modelo. Este comportamiento sugirió la presencia de un fenómeno de “stacking” involucrando los protones de la cara α de manosa (en **1**) y talosa (en **2**) y el residuo de indol que estaría asociado a la existencia de interacciones fuertes CH- π carbohidrato-aromático en el caso de β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**).^[7]

La diferencia de desplazamiento químico, ($\Delta\delta = -0.45$), de los protones Py-5^B entre la estructura hairpin y el modelo de hebra carbohidrato sugiere también la presencia de stacking entre las unidades de pirrol de las glico-oligoamidas **1** y **2**. (Tabla 4.7).

La posibilidad de que estos resultados fuesen debidos a procesos de auto-asociación se excluyó mediante la realización de experimentos de dilución. Así, se llevaron a cabo

experimentos de dilución de las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** por RMN en D_2O /Acetona- d_6 , 90:10 a 5 °C (Figura 4.6). Estos experimentos se realizaron en un rango de concentración de 5-500 μM .

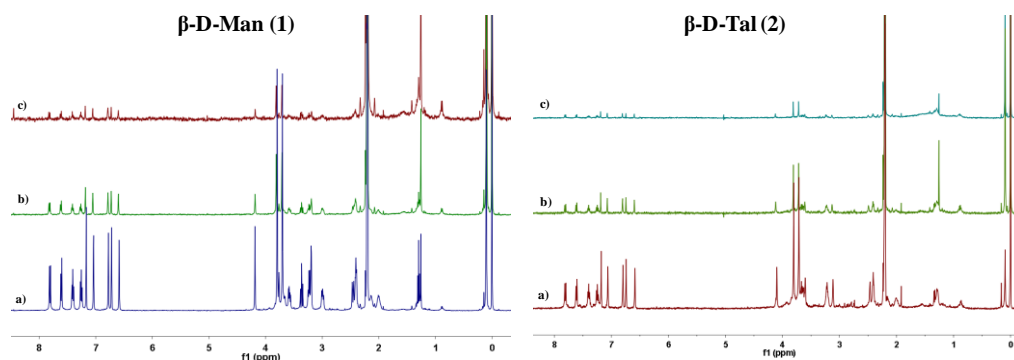


Figura 4.7 Experimento de dilución de **β -D-Man (1)** (izquierda) y **β -D-Tal (2)** en D_2O /Acetona- d_6 a 5 °C a una concentración de: a) 500, b) 50 y c) 5 μM . Se empleó como referencia TSP por la señal residual a 0.00 ppm en el espectro de 1H -RMN.

Como puede observarse en la figura 4.7 no se apreciaron diferencias de desplazamiento químico con la concentración. Así, la RMN sugirió que las glico-oligoamidas estudiadas se encuentran como especies monoméricas en el rango de concentración de 5-500 μM .

Por otro lado, estudiamos las diferencias de δ de las resonancias de la cadena γ del fragmento -Py- γ -Py-Ind entre glico-oligoamidas que contienen el OH-2 en configuración ecuatorial y glico-oligoamidas que contienen el OH-2 axial. La cadena γ alifática, mostró dos tipos de señales para el metileno $CH_2\gamma_b$, (γ_b y γ_b'), para las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**, mientras que, las glico-oligoamidas **3** y **4** no mostraron esta separación. (Ver tabla 4.8).

Tabla 4.8 Diferencia de desplazamientos químicos entre glico-oligoamidas con OH-2 en posición axial frente a glico-oligoamidas con OH-2 en posición ecuatorial. $\Delta\delta_{(1)-(3)} = \delta_{\beta\text{-D-Man (1)}} - \delta_{\beta\text{-D-Glc (3)}}$, $\Delta\delta_{(2)-(4)} = \delta_{\beta\text{-D-Tal (2)}} - \delta_{\beta\text{-D-Gal (4)}}$.

Señal	$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Glc (3)}$	(1) - (3)	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-D-Gal (4)}$	(2) - (4)
	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
NH-1	11.12	11.04	+0.08	11.08	11.02	+0.06
NH-2	10.10	10.18	-0.08	10.06	10.16	-0.10
NH-4	9.86	9.89	-0.03	9.84	9.89	-0.05
NH-3	7.86	7.90	-0.04	7.82	7.86	-0.04
NH-5	7.52	8.56	-1.04	7.62	8.63	-1.01
In-4	7.81	7.77	+0.04	7.78	7.76	+0.02
In-7	7.60	7.56	+0.04	7.58	7.56	+0.02
In-6	7.40	7.36	+0.04	7.37	7.36	+0.01
In-5	7.26	7.21	+0.05	7.23	7.20	+0.03
In-3	7.14	7.20	-0.06	7.11	7.17	-0.06
Py-5 ^A	6.99	7.12	-0.13	6.99	7.13	-0.14
Py-5 ^B	6.74	6.89	-0.15	6.75	6.89	-0.14
Py-3 ^B	6.73	6.69	+0.04	6.73	6.71	+0.02
Py-3 ^A	6.56	6.57	-0.01	6.53	6.54	-0.01
OH-4	6.14	6.61	-0.47	5.26	6.07	-0.81
OH-2	6.08	6.45	-0.37	5.27	6.32	-1.05
OH-3	5.98	6.40	-0.42	6.13	6.24	-0.11
OH-6	5.89	5.94	-0.05	6.05	6.07	-0.02
H-1	3.98	4.77	-0.79	3.94	4.67	-0.73
Me ^A	3.77	3.74	+0.03	3.74	3.73	+0.01
Me ^B	3.70	3.61	+0.09	3.68	3.60	+0.08
H-2	3.05	3.44	-0.39	3.00	3.70	-0.70
H-3	2.20	3.33	-1.13	2.26	3.53	-1.27
H-4	3.31	3.44	-0.13	3.54	3.91	-0.37
H-5	2.91	3.33	-0.42	3.16	3.57	-0.41
H-6	3.75	3.79	-0.04	3.63	3.70	-0.07
H-6'	3.56	3.66	-0.10	3.63	3.70	-0.07
γa	3.75	3.44	+0.31	3.63	3.48	+0.15
$\gamma\text{a}'$	3.18	3.44	-0.26	3.16	3.36	-0.20
γc	2.39	2.42	-0.03	2.38	2.41	-0.03
γb	2.20	2.04	+0.16	2.14	2.02	+0.12
$\gamma\text{b}'$	1.98		-0.06	1.97		-0.05

También fue muy notable la diferencia de desplazamiento químico entre las resonancias de los protones del carbohidrato (**1** vs **3** y **2** vs **4**). Especialmente entre los protones del carbohidrato que se sitúan en la cara α de β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**). Dichos protones sufrieron un desplazamiento a campo bajo. $\Delta\delta_{(1)-(3)} = -0.79$ y -0.39 , -1.13 y -0.42 ppm, $\Delta\delta_{(2)-(4)} = -0.73$, -0.70 , -1.27 y -0.41 ppm para H-1, H-2, H-3 y H-5 respectivamente. Además, los protones de β -D-Man (**1**), Py-5^A y Py-5^B, mostraron un desplazamiento a campo bajo de 0.13 y 0.15 ppm respectivamente comparados con los de β -D-Glc (**3**). El mismo comportamiento se encontró para β -D-Tal (**2**), (0.14 y 0.14 ppm), comparado con β -D-Gal (**4**). (Ver tabla 4.8).

Si observamos los protones intercambiables, podemos apreciar que de los protones amídicos, NH-5 sufre un mayor desplazamiento químico al comparar **1** vs **3** y **2** vs **4**. Para los protones hidroxilo, son OH-2 y OH-4 los que se ven más afectados en la pareja de glico-oligoamidas (**2**)-(4). Esto se tratará más en profundidad en el apartado 4.2 de caracterización de EHs intramoleculares en **1** y **2**.

Así, la comparación de los desplazamiento químicos de **1** vs **3** y **2** vs **4** a -15 °C sugieren que la estructura de horquilla está conformacionalmente mejor definida para las glico-oligoamidas **1** y **2** con el OH-2 axialmente orientado que para **3** y **4**.

4.1.3. Determinación de la conformación del enlace amido-glicosídico.

Los estudios estructurales realizados en el estado enlazado con las oligoamidas de Dervan y nuestras glico-oligoamidas han mostrado que estos compuestos se asocian al surco menor del ADN con una orientación de sus arcos, interior y exterior, bien definida. Por lo tanto el conocimiento de la disposición relativa y orientación del carbohidrato respecto del resto de la molécula en las nuevas glico-oligoamidas diseñadas es muy importante. Así, la implicación que el carbohidrato puede tener en el proceso de reconocimiento molecular con ADN, según vimos en los esquemas 1.1, 1.2 y 1.3 de la introducción, es diferente según sea la conformación del enlace amido-glicosídico, *Z-syn* o *Z-anti* y la orientación de los centros del carbohidrato hacia el interior del surco menor del ADN.

La conformación del enlace amido-glicosídico puede determinarse mediante estudios de RMN, rayos X y cálculos computacionales.^[8] Los parámetros de RMN de constantes de acoplamiento *J* y nOes son de gran ayuda para el análisis de dicha conformación.

Los experimentos NOESY y ROESY han permitido obtener información sobre la conformación del carbohidrato en las diferentes glico-oligoamidas.

La existencia de nOes entre H-1/H-3, H-1/H-5 y H-3/H-5 para las glico-oligoamidas **1-4** indican que la conformación del anillo de piranosa de los diferentes carbohidratos es 4C_1 . Para el caso de las glico-oligoamidas con OH-2 en configuración axial se encontró, además, un nOe H-1/-H-2 tanto en el derivado de manosa **1** como en el de talosa **2**. (Figura 4.8).

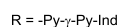
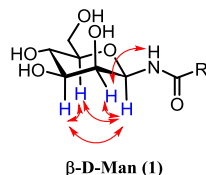


Figura 4.8 Ejemplo de nOes encontrados para el fragmento de carbohidrato de la glico-oligoamida β -D-Man (**1**).

Así la conformación del enlace amido-glicosídico estará definida por el ángulo de torsión Φ (H1-C1-N5-H5) del enlace entre C-1 y N5 del carbohidrato y la conformación de la amida *carbohidrato-NH-CO-Py- γ -Py-Ind*. Dependiendo del valor del ángulo de torsión Φ (H1-C1-N5-H5) podemos hablar de una conformación *syn* o *anti* (figura 4.9), sin embargo, si hacemos referencia a la amida hablaremos de configuración Z o E (figura 4.9).

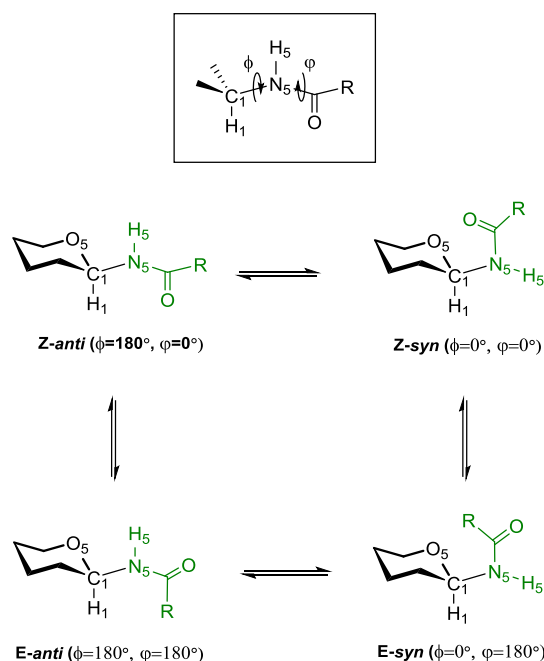


Figura 4.9 Representación de las conformaciones *syn* y *anti* para los isómeros Z y E de glicosilamidas.

Los estudios conformacionales han demostrado que, en general, las glicosilamidas existen preferentemente en una conformación *Z-anti* en torno al enlace amidoglicosídico.^[8-9]

En las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** pudo ponerse de manifiesto la configuración *Z* del enlace amida mediante la detección del nOe NH-5/Py-3^B en los espectros NOESY en H₂O/Acetona-d₆ (90:10) a – 15 °C. (Figura).

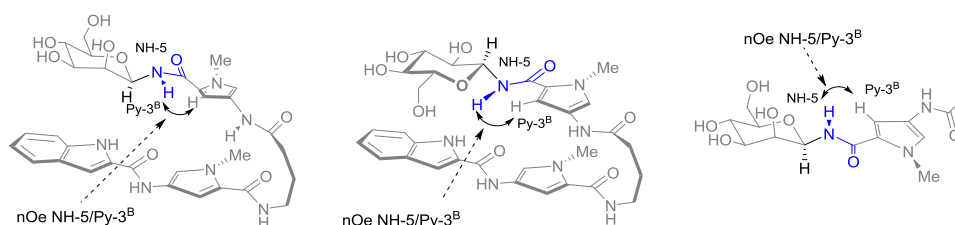


Figura 4.10 Isómeros *Z* del enlace amidoglicosídico en las glico-oligoamidas con OH-2 axial, β -D-Man (**1**), con OH-2 ecuatorial, β -D-Glc (**3**) y el modelo de hebra carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (**5**).

Para obtener información acerca del ángulo de torsión entre los protones H-1 y NH-5 de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** se midió el valor de la constante de acoplamiento $^3J_{\text{NH-5,H-1}}$ en dichos compuestos obtenida de los espectros de ¹H-RMN en H₂O/Acetona-d₆ (90:10) a – 15 °C. (Tabla 4.9).

Tabla 4.9 Valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-5,H-1}}$ obtenidas en los espectros de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6**.

	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)	β -D-Man-Py-NHAc (5)	β -D-Tal-Py-NHAc (6)
$^3J_{\text{NH-5,H-1}}$	8.6 Hz	8.9 Hz	8.9 Hz	8.9 Hz	8.6 Hz	8.2 Hz

En todos los casos se midieron constantes de acoplamiento grandes, entre 8.2 y 8.9 Hz. Estos valores son compatibles con ángulos diedros próximos a 0° y 180°, es decir, a una conformación *syn* o *anti* respectivamente. La diferenciación entre ambas conformaciones alrededor del enlace amidoglicosídico deriva en los nOes NH-5/H-1 o NH-5/H-2. Tanto para las glico-oligoamidas **1** y **2**, con OH-2 axial, como para las glico-oligoamidas **3** y **4**, con OH-2 ecuatorial, se detectaron picos de cruce nOe fuertes NH-5/H-2 correspondientes a una conformación *anti* predominante que sitúa al H-2 de ambos tipos de glico-oligoamidas cercano al protón NH-5 amídico. (Figura 4.11).

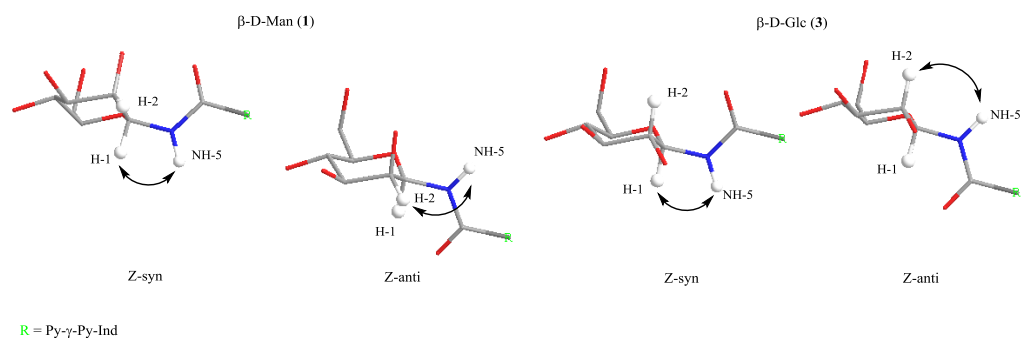


Figura 4.11 Proximidad espacial de los protones H-1 y H-2 a NH-5 en función de la configuración del hidroxilo en C-2 y en función de la conformación del enlace amidoglicosídico de las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Glc (3).

Para los modelos de hebra carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal Py-NHAc (6), la conformación del enlace amidoglicosídico también resultó ser *Z-anti* caracterizado por los valores altos de las constantes de acoplamiento (8.6 y 8.2 respectivamente) y los nOes intrahebra NH-5/Py-3^B y NH-5/H-2.

Basándonos en estos resultados, como conclusión, una conformación *Z-anti* sugiere que los valores de los ángulos dihedros Φ y ϕ se corresponderían con los valores de 180 y 0° respectivamente.

Como veremos más adelante los cálculos computacionales de dinámica molecular respecto al estudio conformacional de los compuestos 1-4 así como de los modelos de hebra 5 y 6 apoyarán los datos experimentales obtenidos en los estudios de RMN.

4.1.4. Estructura en horquilla de las glico-oligoamidas 1-4 y definición de los centros que determinan los arcos NH y N-Metilo (N-Me).

Además de los nOes inter-hebra que evidencian la presencia de un cierto porcentaje de conformación plegada en horquilla, en las glico-oligoamidas 1-4, se identificaron nOes intrahebra comunes entre los protones amídicos y los protones en posición 3 de los anillos pirrólicos (Figura 4.12).

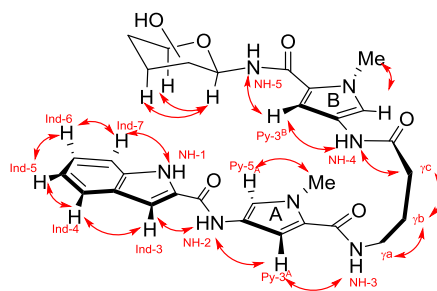


Figura 4.12 Representación de los nOes intra-hebra comunes a las glico-oligoamidas **1-4**.

Estos nOes intra-hebra encontrados en las glico-oligoamidas **1-4** caracterizan la forma arqueada de estas moléculas con un arco interior delimitado por los grupos NH y Py-3 presentes en la estructura, (arco NH), y otro arco exterior delimitado por los metilos Me^A y Me^B de los anillos de los pirroles, (arco N-Me). Por lo tanto las glico-oligoamidas **1-4** presentan en el estado libre una forma arqueada similar a la que presentan las oligoamidas de Wemmer en el estado enlazado y a las glico-oligoamidas y miméticos de factores de transcripción anteriormente estudiadas en nuestro grupo de investigación tanto en el estado libre en disolución acuosa como en el estado asociado a ADN.

De los datos obtenidos de los picos de cruce nOe, (ver figura 4.5 y tabla 4.5), y los estudios de diferencia de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$), (tablas 4.7 y 4.8), podemos concluir que las glico-oligoamidas **1-4** poseen una estructura en horquilla en el estado libre en disolución acuosa a - 15 °C.

Así, la diferente selección del indol por una cara particular del carbohidrato de la glico-oligoamida dependiendo de la configuración del centro C2 apunta a que las interacciones CH- π carbohidrato-aromático son el origen de esta selección de cara.

Si además de los datos de δ y nOes inter-hebra encontrados, tenemos en cuenta la conformación *Z-anti* del enlace amido-glicosídico, de las glico-oligoamidas **1-4**, caracterizada mediante las constantes de acoplamiento $J_{\text{NH-5,H-1}}$ (tabla 4.9) y los nOes observados NH-5/H-2 y NH-5/Py-3^B, podemos establecer la existencia de dos tipos de plegamiento diferentes para los dos tipos de glico-oligoamidas con distinta configuración en C2. (Ver figura 4.13).

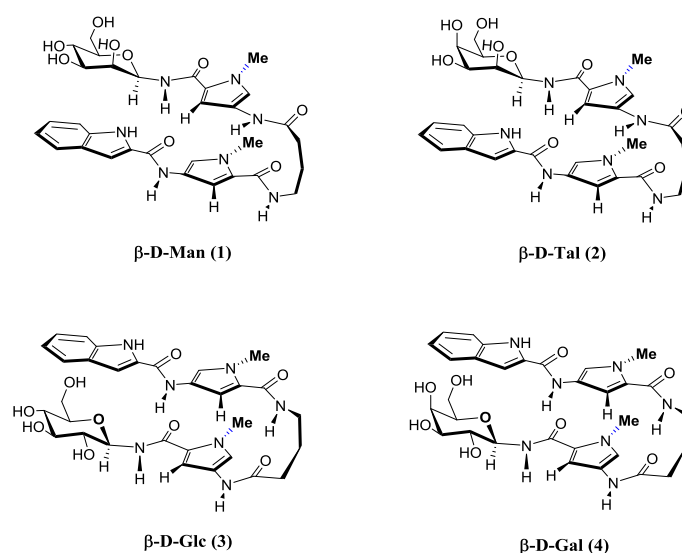


Figura 4.13. Plegamientos, estando el arco NH dirigido hacia el lector, de las glico-oligoamidas **1** y **2** con OH-2 en configuración axial y **3** y **4** con OH-2 en configuración.

Así, la hebra indol se situará estableciendo interacciones de “stacking” con la hebra carbohidrato en un sentido o en otro dependiendo de la cara del carbohidrato seleccionada por el anillo indol.

Por lo tanto, haciendo referencia a las posibilidades conformacionales, (representadas en el esquema 1.1 y 1.3 de la páginas 48 y 50 del capítulo de introducción), y, teniendo en cuenta que el sentido del plegamiento se define desde el arco exterior N-Me, para glico-oligoamidas con carbohidratos de la serie D, en el caso de los derivados **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**, tenemos un plegamiento que se corresponde con la **Estructura A**. (Ver figura 4.14). Para el caso de las glico-oligoamidas **β -D-Glc (3)** y **β -D-Gal (4)** el plegamiento se correspondería con el de la **Estructura B**. Así para **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** tenemos un plegamiento **N-C**, (definido en el sentido de las agujas del reloj), con los centros **O5** y **C5** orientados **hacia el arco N-Me** y la **cara α** del carbohidrato próxima al indol. (Ver figura 4.14). Sin embargo, para **β -D-Glc (3)** y **β -D-Gal (4)** tendríamos un plegamiento **C-N**, con los centros **O5** y **C5** dirigidos también **hacia el arco N-Me** y siendo la **cara β** esta vez la seleccionada por el indol. (Ver figura 4.14 y 4.15).

En lo que respecta a los centros dadores de EH cooperativos, OH-2 de β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**) se encontrarían orientados hacia el arco NH y por lo tanto, hacia el interior del surco menor del ADN si la conformación no cambia al formar el complejo con el receptor.

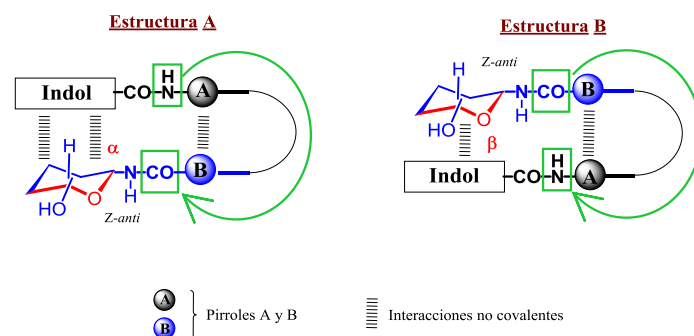


Figura 4.14. Estructuras correspondientes a los plegamientos de las glico-oligoamidas β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**), (izquierda) y β -D-Glc (**3**) y β -D-Gal (**4**), (derecha).

Si representamos las glico-oligoamidas en el interior de una caja los dos arcos de las glico-oligoamidas quedan bien definidos: arcos NH, (próximo al lector, en rojo), y arco N-Me, (alejado del lector, en azul). Así, la figura a continuación ofrece una forma muy visual de estructura tridimensional de las glico-oligoamidas **1-4** en el estado libre en disolución acuosa

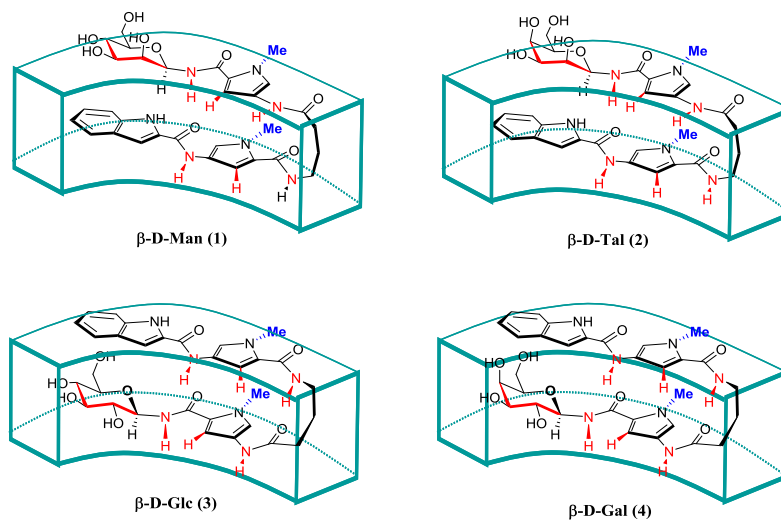


Figura 4.15. Representación de los centros que definen los arcos interior (NH) y exterior (Metilo) de las glico-oligoamidas **1-4**.

Como conclusión, en la siguiente tabla se muestran las características estructurales de las glico-oligoamidas **1-4**. Se define: el tipo de plegamiento $N \rightarrow C$ o $C \rightarrow N$, la cara del carbohidrato cercana al indol y los centros del carbohidrato orientados hacia el arco NH.

Tabla 4.10. Características estructurales de las glico-oligoamidas **1-4**.

	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)
Plegamiento (en el sentido de las agujas del reloj mirando desde el arco N-Me)	$N \rightarrow C$		$C \rightarrow N$	
Cara seleccionada por el indol	α		β	
Centros orientados hacia el arco NH	C2, C3			
Conformación enlace amido-glicosídico	<i>Z-anti</i>			

Este estudio conformacional de las glico-oligoamidas en disolución acuosa a baja temperatura por RMN nos ha permitido determinar que los centros dadores de EH cooperativos C2, (OH-2), de **β -D-Man (1)** se orientan hacia el arco NH de la glico-oligoamida. Entonces, si la conformación en el estado libre si mantuviera en el estado asociado al ADN, C2 (OH-2) estaría cercano al interior del surco menor pudiendo formar enlaces de EH cooperativos con los centros de EH aceptores de las bases del ADN.

4.2. Caracterización de EHs intramoleculares en las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Tal (2) en H₂O a baja temperatura.

El objetivo de este apartado es la caracterización de redes de EH intramoleculares en glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de manosa β -D-Man (1) y de talosa β -D-Tal (2) por RMN en disolución acuosa.

4.2.1. Detección y asignación de las resonancias de los protones intercambiables de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4) y los modelos de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6) en H₂O a baja temperatura.

En esta tesis se abordarán los estudios de caracterización de EH por RMN mediante la medida de desplazamientos químicos inducidos (δ), constantes de acoplamiento (J), coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) y picos de cruce nOe.^[10] Dichos estudios se basan en la obtención de parámetros de RMN tales como desplazamientos químicos (δ), constantes de acoplamiento (J), coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$), medidas de velocidad de intercambio (k_x), efectos isotópicos de deuterio sobre desplazamientos químicos de ¹³C y nOes. Además se han realizado estudios computacionales de Mecánica, Dinámica Molecular y cálculos *ab initio* como apoyo a los experimentos realizados por RMN.

Para abordar dichos estudios de caracterización de EHs el primer paso llevado a cabo ha sido la detección y asignación de todas las resonancias de los grupos intercambiables hidroxilo y NH amido de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos **5-6** en H₂O a -15 °C. En la figura 4.18 se muestra la estructura de los compuestos **1-6** con la nomenclatura utilizada para la asignación de los grupos intercambiables.

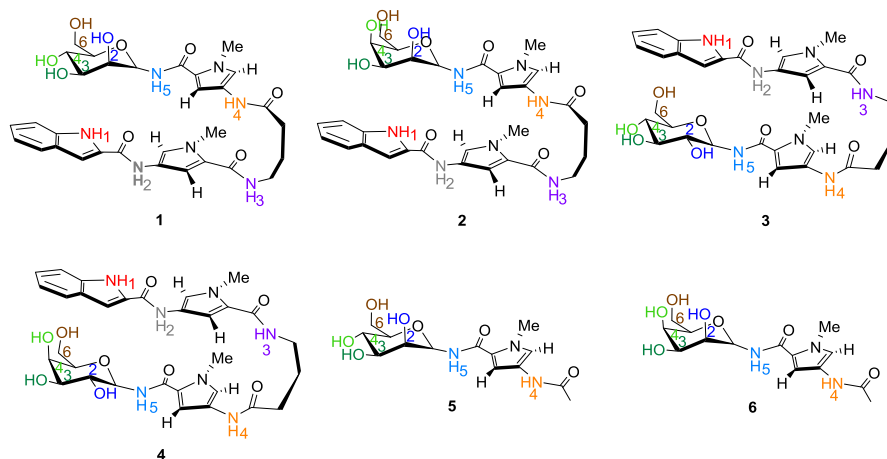


Figura 4.18. Estructura de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** y los diferentes protones intercambiables NH y OH.

La detección y asignación de las resonancias de los protones amídicos e hidroxilo intercambiables se realizó mediante espectros de ^1H -RMN, TOCSY ($\tau = 60$ ms) y NOESY ($\tau = 400$ ms) en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a -15°C . (Figuras 4.19 y 4.20).^a

^a La acetona fue utilizada como co-disolvente permitiendo, además de la estabilización del lock, el descenso de la temperatura hasta -15°C y evitando la congelación de las muestras. En todos los experimentos de RMN se empleó el TSP como referencia interna

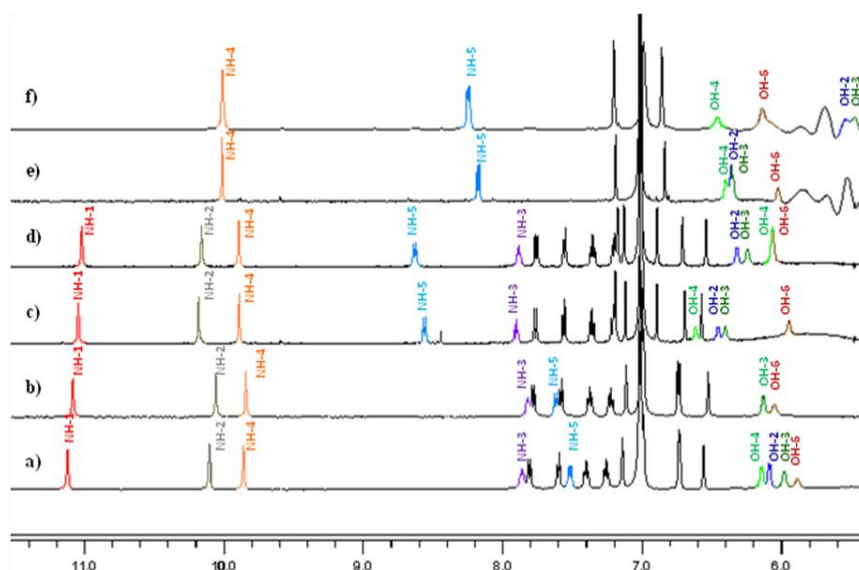


Figura 4.19 Espectros de ^1H -RMN de a) β -D-Man (1), b) β -D-Tal (2), c) β -D-Glc (3), d) β -D-Gal (4), e) β -D-Man-Py-NHAc (5) y f) β -D-Tal-Py-NHAc (6) en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ a -15°C . La señal de los OHs del hidrato de acetona fue detectada a 7.00 ppm.

La asignación de las resonancias de los protones intercambiables OH-2 y OH-4 en el derivado de talosa **2** sólo fue posible mediante el análisis del espectro TOCSY por quedar dichas resonancias debajo de la señal del agua suprimida. (Figura 4.19).

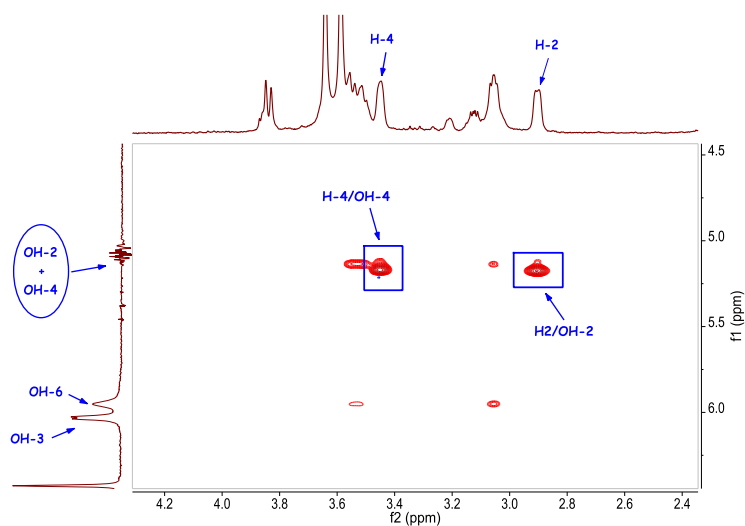


Figura 4.20 Ampliación del espectro TOCSY de β -D-Tal (**2**) en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ a $-15\text{ }^\circ\text{C}$: desplazamientos químicos de los protones intercambiables OH-2 y OH-4.

En la tabla 4.11 se muestran los valores de desplazamiento químico de todas las resonancias de los protones NH y OH de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra carbohidrato **5** y **6** en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ a $-15\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla 4.11 Desplazamientos químicos (δ) (ppm ± 0.01) para todas las resonancias de los protones de los grupos NH amídicos y OH de los compuestos **1-6** en $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a $-15\text{ }^\circ\text{C}$.

		δ (ppm)					
		β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Man-Py-NHAc (5)	β -D-Tal-Py-NHAc (6)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)
Concentración		10^{-4} M					
Protones NH	NH-1	11.12	11.08	-	-	11.04	11.02
	NH-2	10.10	10.06	-	-	10.18	10.16
	NH-3	7.86	7.82	-	-	7.90	7.88
	NH-4	9.86	9.84	10.01	10.01	10.01	10.01
	NH-5	7.52	7.62	8.18	8.25	8.56	8.63
Protones OH	OH-2	6.08	5.27	6.36	5.54	6.45	6.32
	OH-3	5.98	6.13	6.36	5.47	6.40	6.24
	OH-4	6.14	5.26	6.41	6.46	6.61	6.06
	OH-6	5.88	6.05	6.02	6.14	5.94	6.06

Lo más significativo es el apantallamiento de NH-5, OH-2 en **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** así como de OH-4 en **β -D-Tal (2)**.

En la figura 4.21 se muestra una ampliación de los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **1-6**. La línea punteada marcada en color azul representa el significativo apantallamiento que sufre el NH-5 glicosídico. Así, para los seis compuestos podemos distinguir tres tipos de NH-5 diferentes en función de su valor de δ .

Existe una tendencia de apantallamiento en el protón NH-5 desde las glico-oligoamidas **3** y **4** con OH-2 en configuración ecuatorial hacia las glico-oligoamidas **1** y **2** con OH-2 en configuración axial, mostrando el NH-5 en los modelos **5** y **6** un valor de desplazamiento químico intermedio. (Ver figura 4.21)

Los NH-5 más apantallados en **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** (7.52 y 7.62 ppm respectivamente), se corresponderían con las resonancias de los protones amídicos anoméricos involucradas en posibles redes de EH intramoleculares: NH-5 \cdots OH-2 en **β -D-Man (1)** y NH-5 \cdots OH-2 \cdots OH-4 en **β -D-Tal (2)**.

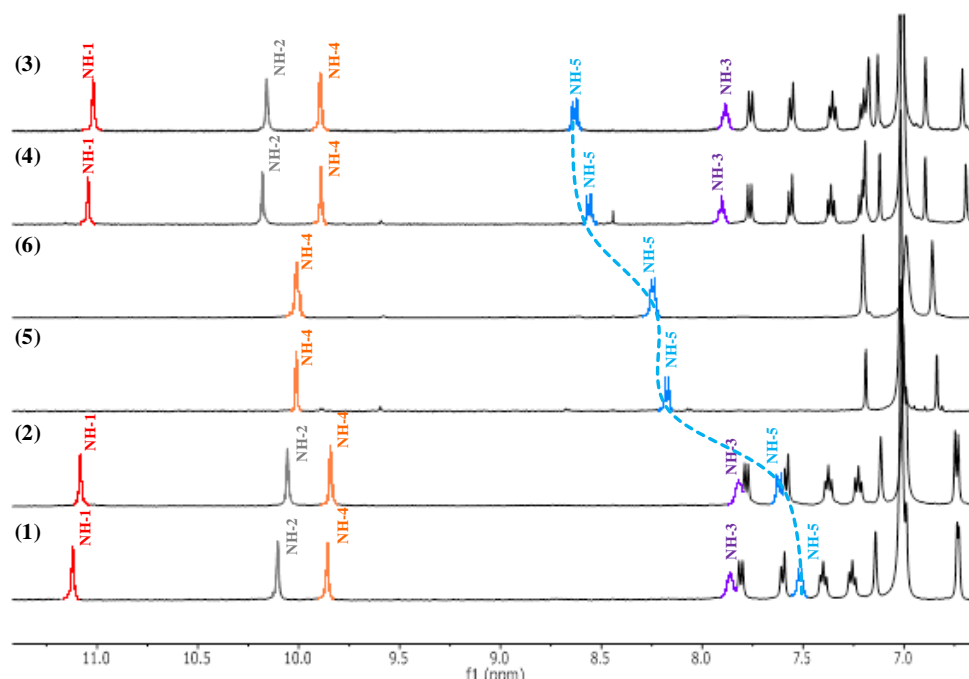


Figura 4.21. Ampliación de la región espectral de los protones amídicos de las glico-oligoamidas con posibles centros dadores de EH cooperativos **β -D-Man (1)**, y **β -D-Tal (2)**, de los modelos de hebra carbohidrato **β -D-Man-Py-NHAc (5)**, y **β -D-Tal-Py-NHAc (6)**, y las glico-oligoamidas modelo **β -D-Glc (3)** y **β -D-Gal (4)**.

Así, la tendencia de desplazamiento químico de los NH-5 amídicos para los derivados **1-6** puede representarse de la siguiente forma:

$$\delta_{\text{NH-5(glico-ec)}} > \delta_{\text{NH-5(hebra azúcar)}} > \delta_{\text{NH-5(glico-ax)}}$$

En el caso de los OHs, la figura 4.22 muestra una ampliación de los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **1-6** en la que la línea punteada marcada en color azul representa el significativo apantallamiento que sufre el hidroxilo OH-2.

En nuestro caso, los valores de δ de los hidroxilos más apantallados se corresponden con OH-2 y OH-4 de **β -D-Tal (2)**, (ver tabla 4.10 y figura 4.22), grupos de los que se espera que participen en la red de EH intramolecular del derivado de talosa **2**.

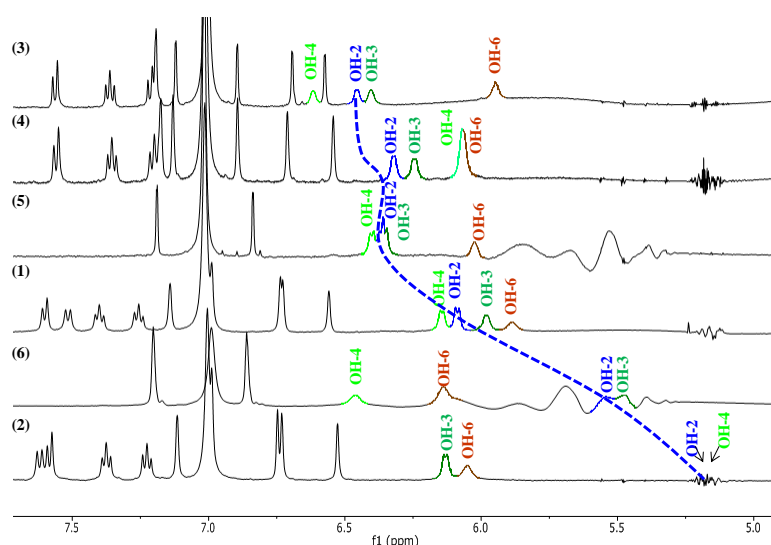


Figura 4.22. Ampliación de la región espectral de los protones hidroxilo de los derivados **β -D-Tal (2)** y **β -D-Tal-Py-NHAc (6)** con dos posibles EHs intramoleculares, **β -D-Man (1)** y **β -D-Man-Py-NHAc (5)**, con un posible EH intramolecular y de las glico-oligoamidas modelo **β -D-Gal (4)** y **β -D-Glc (3)**.

Por otro lado, una característica general de los grupos hidroxilo es que el valor de δ se desplaza a campo bajo en protones que participan en EHs, sin embargo, se han encontrado ejemplos en bibliografía de protones OHs de carbohidratos que se encuentran apantallados.^[11]

Como puede observarse, en la figura 4.22, existe una tendencia de apantallamiento en el desplazamiento químico del OH-2 desde los derivados con OH-2 ecuatorial hacia aquellos que tienen el OH-2 en configuración axial especialmente en la glico-oligoamida **β -D-Tal (2)**.

Así mismo, existe además tendencia de apantallamiento en OH-2 desde los derivados de manosa **1** y **5** hacia los de talosa **2** y **6**. Podemos resumir entonces que:

$$\delta_{\text{OH-2ec}} > \delta_{\text{OH-2ax}}$$

$$\delta_{\text{OH-2(Man)}} > \delta_{\text{OH-2(Tal)}}$$

Así, podemos decir que para las glico-oligoamidas con posibilidad de formar redes de EH intramoleculares, **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**, hay una tendencia al apantallamiento en el valor del desplazamiento químico de los protones intercambiables NHs y OHs que podrían estar involucrados en EHs.

4.2.2. Análisis de los parámetros de RMN, (J , $\Delta\delta$ y $\Delta\delta/\Delta T$ y nOes), de los protones intercambiables, obtenidos en H₂O a baja temperatura para la caracterización de EH intramoleculares de las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**.

Como se comentó anteriormente, además de los desplazamientos químicos (δ), los parámetros de RMN que se han estudiado para caracterizar la redes de EH intramoleculares son constantes de acoplamiento (J), diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$), coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) y nOes de NHs y OHs. En la tabla Tabla 4.12 se recogen estos parámetros para los compuestos **1-6**.

Tabla 4.12 Constantes de acoplamiento (J), diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) y coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) medidos entre 0 °C y - 15 °C de todas las resonancias de los protones intercambiables NH y OH de las glico-oligoamidas **1-6** medidas en H₂O/Acetona-d₆ a - 15 °C.

		NH-1	NH-2	NH-3	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
β-D-Man (1)	J (Hz)	s	s	6.4	s	8.6	6.4	6.1	3.6	br,s
	$\Delta\delta$ (ppm)	-0.081	-0.048	-0.079	-0.070	-0.002	-0.084	-0.126	-0.136	-0.150
	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	5.5	3.2	5.3	4.7	0.2	5.7	8.6	9.1	10.2
β-D-Tal (2)	J (Hz)	s	s	5.8	s	8.9	a	6.3	a	br,s
	$\Delta\delta$ (ppm)	-0.062	-0.021	-0.065	-0.063	-0.005	-0.020	-0.142	-0.069	-0.155
	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	4.1	1.4	4.4	4.2	0.3	1.4	9.4	4.6	10.2
β-D-Glc (3)	J (Hz)	s	s	6.1	s	8.9	br,s	br,s	br,s	br,s
	$\Delta\delta$ (ppm)	-0.045	-0.034	-0.048	-0.074	-0.069	-0.111	-0.127	-0.149	-0.154
	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	3.0	2.3	3.2	5.0	4.6	7.5	8.6	10.3	10.3
β-D-Gal (4)	J (Hz)	s	s	6.1	s	8.9	br,s	br,s	br,s	br,s
	$\Delta\delta$ (ppm)	-0.042	-0.031	-0.043	-0.078	-0.076	-0.124	-0.138	-0.162	-0.162
	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	2.8	2.1	2.9	5.2	5.1	8.3	9.2	10.8	10.8
β-D-Man-Py-NHAc (5)	J (Hz)	-	-	-	s	8.6	6.3	6.3	5.9	br,s
	$\Delta\delta$ (ppm)				-0.110	-0.090	-0.150	-0.150	-0.190	-0.180
	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)				7.0	5.0	10.0	10.0	12.0	12.0
β-D-Tal-Py-NHAc (6)	J (Hz)	-	-	-	s	8.2	br,s	br,s	br,s	br,s
	$\Delta\delta$ (ppm)				-0.130	-0.109	-0.228	-0.223	-0.228	-0.265
	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)				8.7	7.0	15.1	14.8	14.8	17.6

^a No fue posible la medida de las constantes de acoplamiento de OH-2 y OH-4 en **β-D-Tal (2)** debido al solapamiento con la señal del agua.

Así, se encontraron diferencias significativas en los parámetros correspondientes para ambos tipos de glico-oligoamidas (**1-2** frente a **3-4**).

Respecto a las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{OH, CH}}$ es conocido que para grupos hidroxilo sin una orientación predominante, los valores de las J rondan los 5.5 ± 0.5 Hz. Sin embargo, valores más grandes o más pequeños de constantes de acoplamiento indican una geometría preferida y un giro alrededor del ángulo dihedro H—C—O—H relativamente restringido. De acuerdo a la ecuación de Karplus^[12] una constante de acoplamiento de aproximadamente 9 Hz indica una conformación predominante del 70% en la cual el enlace O—H esta casi en *anti* al enlace C—H. Así, es posible que el protón hidroxilo esté bloqueado en una orientación alrededor del enlace C—O que da lugar a la obtención de ese valor de constante de acoplamiento, típico de grupos OH restringidos e involucrados en un EH. Por lo tanto, la

restricción rotacional alrededor del enlace C–O puede indicar que un determinado OH esté involucrado en un EH.

Desafortunadamente no se pudieron medir las constantes de acoplamiento de los hidroxilos OH-2 y OH-4 de **β -D-Tal (2)** debido al solapamiento con la supresión de la señal del agua.

De las constantes de acoplamiento que pudieron ser medidas, OH-2 de **β -D-Man (1)**, mostró el valor más grande de todas las J de los protones OH indicando la posibilidad de una orientación tipo *anti* entre el protón hidroxilo y H-2. En el resto de los casos, no se pudo deducir la preferencia de orientación.

Si observamos las constantes de acoplamiento entre NH-5 y H-1, los valores obtenidos de $^3J_{\text{NH-5/H-1}}$ para las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra azúcar **5** y **6** son similares, (entre 8.2 y 8.9 Hz), reflejando una conformación similar alrededor del enlace amido-glicosídico. Por lo tanto, como se explicó en el apartado 4.1.3, estos valores de constantes de acoplamiento, junto con la detección del nOe NH-5/H-2 indican una orientación predominante tipo *anti* entre NH-5 y H-1.

Uno de los parámetros que nos ha proporcionado indicios más concluyentes de la existencia de EHs intramoleculares en las glico-oligoamidas **1** y **2** ha sido el valor del coeficiente de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) de los grupos intercambiables.

En la tabla 4.12 se observa que los valores de ($\Delta\delta/\Delta T$) de los grupos amida NH, están en un rango entre -1.4 y -8.7 ppb/ $^{\circ}\text{C}$ (Tabla 4.12), excepto en el caso del NH-5 en las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**, las cuales son un orden de magnitud más pequeño (-0.2 y -0.3 ppb/ $^{\circ}\text{C}$, respectivamente).

Este dato está de acuerdo con el encontrado en bibliografía donde NHs involucrados en EHs son caracterizados con valores de coeficientes de temperatura pequeños, alrededor de -2.0 ± 1.4 ppb/ $^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, NHs expuestos al disolvente muestran valores en el rango de entre -6.0 y -8.5 ppb/ $^{\circ}\text{C}$.^[13] Aunque los valores pequeños obtenidos de $\Delta\delta/\Delta T$ para muchos de los grupos NH de las glico-oligoamidas, (ver tabla 4.12), pueden estar de acuerdo con la existencia de EHs inter-hebra, el orden de magnitud menor de NH-5 en **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** sostiene que dicho grupo NH amido en estos derivados es menos propenso a interactuar con el disolvente que en los otros análogos y, por lo tanto, apoya la teoría de la existencia de un EH intramolecular entre NH-5 y OH-2 en los derivados **1** y **2**.

En lo que respecta a los grupos hidroxilo de todas las moléculas, de nuevo, OH-2 y OH-4 de **β -D-Tal (2)** muestran los coeficientes de temperatura más pequeños (-1.4 y -4.6 ppb/°C, respectivamente, ver Tabla 4.12) seguidos por OH-2 de **β -D-Man (1)**, (-5.7 ppb/°C). Hay precedentes en la bibliografía que indican que aquellos grupos hidroxilo involucrados en EHs fuertes muestran coeficientes de temperatura de valores absolutos de 4 ppb/°C o inferiores.^[10c,14]

Si comparamos estos valores con los de los coeficientes de temperatura de las glico-oligoamidas **3** y **4**, podemos observar que existe una gran diferencia especialmente entre los $\Delta\delta/\Delta T$ de NH-5: 0.2 en **β -D-Man (1)** y 0.3 ppb/ °C en **β -D-Tal (2)** frente a 4.6 en **β -D-Glc (3)** y 5.3 ppb/ °C en **β -D-Gal (4)**.

En el caso de los hidroxilos, OH-2: 5.7 en **β -D-Man (1)** y 1.4 ppb/ °C en **β -D-Tal (2)** frente a 7.5 **β -D-Glc (3)** y 8.3 ppb/ °C en **β -D-Gal (4)** y para OH-4: 4.6 ppb/ °C en **β -D-Tal (2)** frente a 10.8 ppb/ °C en **β -D-Gal (4)**. (Ver tabla 4.12 y figura 4.23).

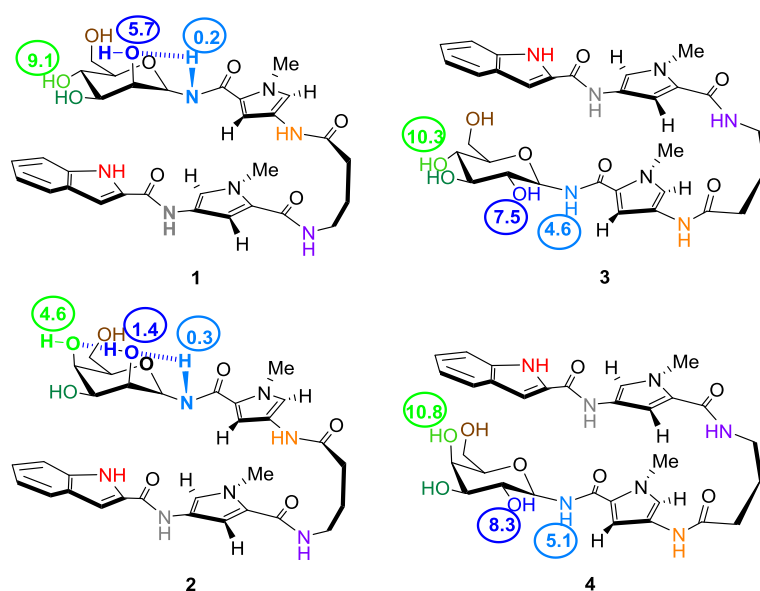


Figura 4.23 Comparación de los valores absolutos de $\Delta\delta/\Delta T$ de los protones intercambiables, de **β -D-Man (1)** vs **β -D-Glc (3)** y **β -D-Tal (2)** vs **β -D-Gal (4)**, que constituyen la red de EH intramolecular propuesta para las glico-oligoamidas **1**, **NH-5...OH-2** y **2**, **NH-5...OH-2...OH-4**.

En conclusión los datos de coeficientes de temperatura apoyan la existencia de una red de EH intramolecular en las glico-oligoamidas **1** y **2** así como la falta de la misma en los derivados **3** y **4** como era de esperar.^b

Finalmente los experimentos NOESY mostraron evidencias adicionales, dado que la presencia de un pico de cruce nOe entre el NH-5 amido-glicosídico y OH-2 de **β -D-Man (1)**, indicó proximidad espacial entre estos protones. (Ver Figura 4.24).

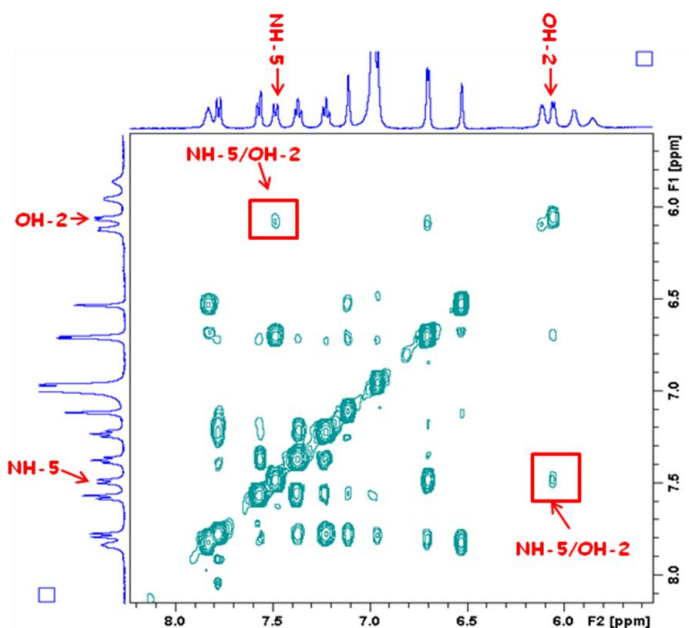


Figura 4.24 Región expandida del espectro NOESY de **β -D-Man (1)** en H₂O/Acetona-d₆ a – 15 °C mostrando el pico de cruce entre NH-5 y OH-2 del carbohidrato.

Así, todos estos datos experimentales confirman que el cambio de la configuración en C-2 del azúcar, de ecuatorial en **3** y **4** a axial en **1** y **2**, permite la formación de la red de EH intramolecular NH-5...OH-2 en **β -D-Man (1)** y NH-5...OH-2...OH-4 en **β -D-Tal (2)** apoyando la existencia de un ciclo de 5 miembros (ec, ax), que involucra al NH ecuatorial de la amida anomérica en posición β y al OH-2 axial de **1** y **2**. Así, OH-2 puede actuar como un donador de EH cooperativo. Además, la red de EH puede extenderse a OH-4 a través de la presencia de un EH intramolecular altamente direccional con una forma de ciclo de 6 miembros (ax, ax) el cual

^b Los valores de $\Delta\delta/\Delta T$ se evaluaron mediante ajuste lineal como se muestra en las figuras 9.3-9.8 del anexo.

permitiría a OH-4 de **β -D-Tal (2)** comportarse como un donador de EH cooperativo en un proceso intermolecular. (Ver Figura 4.25).

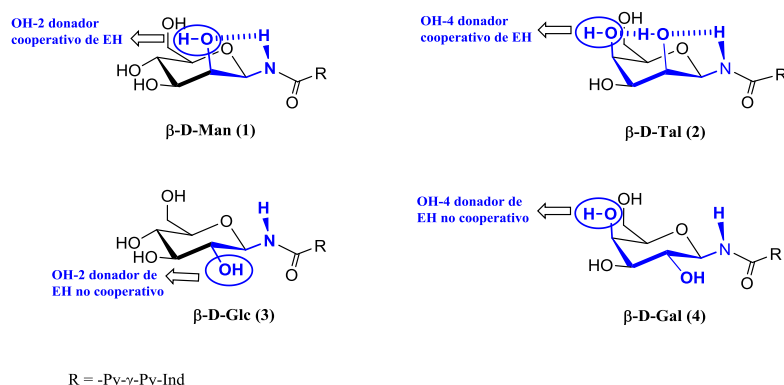


Figura 4.25. Representación de centros dadores de EH cooperativos en **1** y **2** y no cooperativos en **3** y **4**.

4.2.3. Comparación de **β -D-Man (1)** vs **β -D-Man-Py-NHAc (5)** y **β -D-Tal (2)** vs **β -D-Tal-Py-NHAc (6)**.

Para examinar la influencia de la región aromática **-Py-Ind** de la glico-oligoamida sobre el fragmento de azúcar de nuestros ligandos, y, en definitiva, sobre la conformación de la glico-oligoamida se estudiaron los compuestos **β -D-Man-Py-NHAc (5)** y **β -D-Tal-Py-NHAc (6)** y se ha llevado a cabo una comparación de los parámetros de RMN clave, (δ y $\Delta\delta$), entre las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** con dichos modelos de hebra azúcar **5** y **6**.

Así, los valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-5,H-1}}$ en **β -D-Man (1)** y **β -D-Man-Py-NHAc (5)** son idénticos (8.6 Hz), (ver apartado 4.2.2, tabla 4.12), reflejando una conformación análoga alrededor de la unión N-glicosídica. El valor de la constante de acoplamiento $^3J_{\text{NH-5,H-1}}$ también es muy parecido para los derivados de talosa **β -D-Tal (2)** y **β -D-Tal-Py-NHAc (6)**, (8.9 y 8.2 Hz respectivamente).

El estudio comparativo de los desplazamientos químicos de los protones intercambiables ha indicado que hay una tendencia tanto en NH-5, como en OH-2 y OH-4 al apantallamiento. Así, los desplazamientos químicos de estas resonancias en las glico-oligoamidas **1** y **2** son menores que en sus correspondientes modelos de hebra azúcar **5** y **6**.^c (Ver tabla 4.14). Así podemos resumir que:

^c Éstos a su vez están más apantallados que en **3** y **4**.

$$\delta_{\text{NH-5,OH-2,OH-4}}(\text{modelos}) > \delta_{\text{NH-5,OH-2,OH-4}}(\text{glico-oligoamidas})$$

Tabla 4.14. Desplazamientos químicos de las resonancias de los protones intercambiables NHs y OHs de los compuestos **β -D-Man-Py-NHAc (5)**, **β -D-Man (1)**, **β -D-Tal-Py-NHAc (6)** y **β -D-Tal (2)**.

		δ (ppm)			
		β-D-Man-Py-NHAc (5)	β-D-Man (1)	β-D-Tal-Py-NHAc (6)	β-D-Tal (2)
Concentración		10^{-4} M			
Protones NH	NH-1	-	11.12	-	11.08
	NH-2	-	10.10	-	10.06
	NH-3	-	7.86	-	7.82
	OH-4	10.01	9.86	10.01	9.84
	NH-5	8.18	7.52	8.25	7.62
Protones OH	OH-2	6.36	6.08	5.54	5.27
	OH-3	6.36	5.98	5.47	6.13
	OH-4	6.41	6.14	6.46	5.26
	OH-6	6.02	5.88	6.14	6.05

Además, el protón de OH-2, posible centro dador de EH de **β -D-Man (1)** y **β -D-Man-Py-NHAc (5)** y grupo menos expuesto al disolvente en los derivados de talosa **β -D-Tal (2)** y **β -D-Tal-Py-NHAc (6)** posee una tendencia de apantallamiento que podría estar relacionada con la estabilidad de las redes de EH intramoleculares ya que:

$$\delta_{\text{OH-2},(\beta\text{-D-Tal}(2))} < \delta_{\text{OH-2},(\beta\text{-D-Tal-Py-NHAc}(6))} < \delta_{\text{OH-2},(\beta\text{-D-Man}(1))} < \delta_{\text{OH-2},(\beta\text{-D-Man-Py-NHAc}(5))}$$

Sin embargo, sorprendentemente, otros parámetros de RMN como los coeficientes de temperatura, $\Delta\delta/\Delta T$, apuntan a que el EH intramolecular NH-5...OH-2 no es persistente en agua en los modelos de manosa y talosa **5** y **6**. (Ver tabla 4.14 y figura 4.32). Así, mientras que los coeficientes de temperatura de NH-5 y OH-2 en la glico-oligoamida **β -D-Man (1)** son pequeños y característicos de la presencia de un EH intramolecular NH-5...OH-2, para el modelo de hebra azúcar **β -D-Man-Py-NHAc (5)**, estos valores de $\Delta\delta/\Delta T$ fueron mucho más elevados y se encontraron en el rango de aquellos protones intercambiables que no están involucrados en EHs. (- 0.2 y - 5.7 ppb/°C frente a - 5.0 y - 10.0 ppb/°C para NH-5 y OH-2 de **β -D-Man (1)** y **β -D-Man-Py-NHAc (5)** respectivamente).

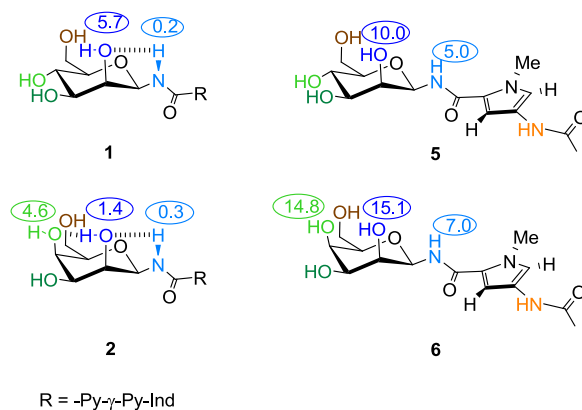


Figura 4.32 Coeficientes de temperatura de las resonancias de los protones intercambiables NH-5, OH-2 y OH-4 en β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6).

El mismo comportamiento fue observado para los derivados de talosa β -D-Tal (2) y β -D-Tal-Py-NHAc (6). (Ver tabla 4.13 y figura 4.32). En este caso, como ya se vio en el apartado 4.2.2, (tabla 4.12), los coeficientes de temperatura de los grupos NH-5, OH-2 y OH-4 de β -D-Tal (2) reflejan claramente su participación en un EH intramolecular (-0.2, -1.4 y -4.6 ppb/°C respectivamente). Sin embargo, los datos de coeficientes de temperatura para el compuesto modelo de hebra azúcar β -D-Tal-Py-NHAc (6), (- 7.0 , -15.1 y -14.8 ppb/°C para NH-5, OH-2 y OH-4 respectivamente) no están de acuerdo con la existencia de una red de EH intramolecular en dicho derivado.

Por lo tanto, los datos experimentales de desplazamiento químico (δ) y coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) apuntan a la existencia de una red de EH intramolecular en las glico-oligoamidas **1** y **2**.

Sin embargo, mientras que los δ indican la posibilidad de formación de EHs en los modelos de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) y β -D-Tal-Py-NHAc (6), los coeficientes de temperatura, muestran a la ausencia de la red de EH en dichos derivados.

Estas claras diferencias experimentales entre **1** y **2** y sus modelos **5** y **6** apuntan a que la hebra indol presente en las glico-oligoamidas β -D-Man (1) y β -D-Tal (2), que genera una estructura en horquilla estabilizada por interacciones CH- π , puede estar facilitando la formación de los EHs intramoleculares y la generación de centros dadores de EH cooperativo en **1** y **2**.

Por otro lado, esta diferencia podría también ser explicada por una diferente solvatación de los dos tipos de molécula (**1** y **2** vs **5** y **6**).

En el siguiente subcapítulo (4.3) se aborda, mediante cálculos, el estudio conformacional y la presencia de EHs y de interacciones CH- π en estos dos tipos de moléculas.

En relación a los cálculos teóricos, se han encontrado ejemplos de sinergia entre interacciones no covalentes que contribuyen a la formación y estabilización de determinados complejos. No sólo se ha analizado el efecto mutuo de interacciones catión- π /EH^[15] y π -stacking/EH^[16] por métodos computacionales, sino que también se ha detectado la coexistencia entre EH e interacciones CH- π .^[17]

En nuestro caso, es evidente que, además de encontrarnos ante un ejemplo de diferente solvatación en las glico-oligoamidas **1** y **2** frente a sus compuestos modelo de hebra azúcar **5** y **6**, no podemos descartar la existencia (en **1** y **2**) de una influencia entre las interacciones CH- π del carbohidrato con el indol y el establecimiento de EHs intramoleculares estables en medio acuoso.

4.3. Cálculos computacionales.

Aunque todos los estudios experimentales, anteriormente presentados, proporcionan evidencias sobre la estructura y conformación de las glico-oligoamidas estudiadas, es importante señalar que el análisis de moléculas flexibles basado en el efecto nOe y en las constantes de acoplamiento escalar J es generalmente insuficiente para determinar las preferencias conformacionales de las moléculas. En los casos en los que la molécula puede presentar varias conformaciones, los datos de RMN representan un promedio de todas las conformaciones presentes en disolución. Por ello, generalmente, resulta oportuno realizar cálculos de dinámica molecular^d para conseguir la determinación correcta de la conformación o conformaciones del compuesto. Aunque la determinación de las geometrías y de las poblaciones relativas es compleja, se ha realizado un tratamiento utilizando cálculos computacionales para apoyar los datos experimentales obtenidos en RMN.

Así, el objetivo de este apartado ha sido obtener información a través de cálculos de Mecánica y Dinámica Molecular,^a (MM y DM), para apoyar los resultados experimentales de las glico-oligoamidas objeto de estudio de este capítulo. Además, se han incluido también cálculos *ab initio*^a para la caracterización de las interacciones de stacking CH- π carbohidrato-

^d Se realiza una breve descripción de los métodos computacionales de MM, DM y cálculos *ab initio* empleados para los cálculos computacionales en el Anexo 9.

indol mediante la caracterización de la función de densidad electrónica del sistema. Tanto los datos experimentales obtenidos en los estudios conformacionales, (apartado 4.1), y de caracterización de EHs intramoleculares, (apartado 4.2), como los teóricos, explican los resultados obtenidos.

4.3.1. Cálculos de Mecánica Molecular (MM) y Dinámica Molecular (DM) de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4).

Como apoyo a los datos experimentales obtenidos, se han llevado a cabo cálculos de Mecánica y Dinámica Molecular de los compuestos **1-4** usando el conjunto de programas AMBER 11.

Se empleó una combinación de campos de fuerzas, Glycam 06, para describir la molécula de azúcar y AMBER (gaff) para reproducir el residuo -Py- γ -Py-Ind. En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda conformacional de cada compuesto, (10.000 estructuras), eligiéndose para las simulaciones de DM solamente los confórmeros que estaban de acuerdo con los datos experimentales de RMN. En concreto, los nOes intra- e inter-hebra observados, las constantes de acoplamiento J calculadas y los valores de desplazamientos químicos, causados por la presencia de la región indólica).

Las simulaciones de DM permitieron evaluar la estabilidad de cada conformación de las glico-oligoamidas **1-4**. Se monitorizar parámetros tales como EHs, interacciones CH- π , nOes inter-hebra, etc. Se llevaron a cabo diferentes tipos de simulaciones de DM, con y sin restricciones. Cuando se aplicaron las restricciones, sólo se incluyeron los nOes intra-hebra tales como NH-2/Py-3^A, Py-3^A/NH-3, NH-4/Py-3^B, Py-3^B/NH-5 y los nOes inter-hebra entre los pirroles Py-5^A/Me^B y Py-5^B/Me^A. La figura 4.26 muestra las estructuras 3D de los confórmeros seleccionados para las simulaciones de Dinámica Molecular. Las simulaciones realizadas sin restricciones, en agua explícita a 25 °C, revelaron que las estructuras en horquilla de los compuestos **β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3)** son estables durante un porcentaje significativo de tiempo durante la simulación.

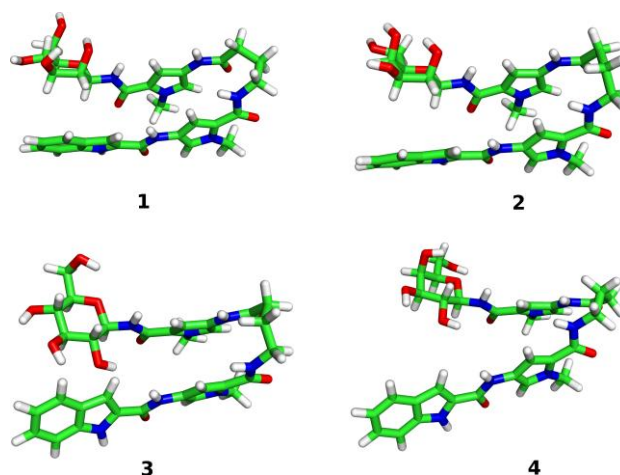


Figura 4.26 Estructura 3D de la conformaciones mayoritarias de las glico-oligoamidas **1-4** seleccionadas de acuerdo a los datos experimentales de RMN, obtenidos después de la búsqueda conformacional y la simulación.

La estructura de horquilla de β -D-Gal (**4**) no fue estable durante la dinámica. Este hecho apoya los resultados experimentales de RMN, que sugirieron una menor estabilidad de la estructura en horquilla de **4** en comparación con las glico-oligoamidas **1-3**. Los detalles de los EHs, las interacciones CH- π y los nOes inter-hebra se muestran a continuación.

- **EHs intramoleculares.** Para los cálculos de DM de β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**) a 25 °C, se obtuvo una población significativa de EH intramolecular NH-5...OH-2. Es decir, durante la DM, se observan distancias entre 1 y 3 Å^[18], (rango de distancia de EH), entre los átomos donador y aceptor de EH durante el 70% del tiempo de dicha DM. Sin embargo, este EH no fue detectado en los derivados β -D-Glc (**3**) y β -D-Gal (**4**). (Ver figura 4.27).

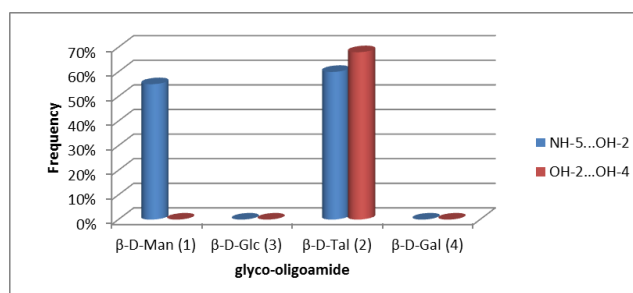


Figura 4.27. Población de los EHs intramoleculares NH-5...OH-2 y OH-2...OH-4 en la estructura en horquilla de las glico-oligoamidas **1-4** obtenidas en las simulaciones de DM en agua explícita a 25 °C.

Además para **β -D-Tal (2)** la distancia de EH OH-2...OH-4 también fue observada durante el 70% del tiempo de simulación (Figura 4.27). Estos estudios computacionales apoyan los valores obtenidos para los coeficientes de temperatura de NH-5 y OH-2 en **β -D-Man (1)** y NH-5, OH-2 y OH-4 en **β -D-Tal (2)**, característicos de grupos involucrados en EHs.

- **Enlace amido-glicosídico.** Los ángulos de torsión glicosídicos definidos por Φ H1-C1-N5-C y ψ C1-N5-C-C fueron monitorizados a lo largo de la DM. El ángulo ψ permaneció en la región anti como se espera para el enlace tipo amida mientras que el ángulo Φ presenta fluctuaciones pequeñas alrededor de 30-40°. (Figura 4.28).

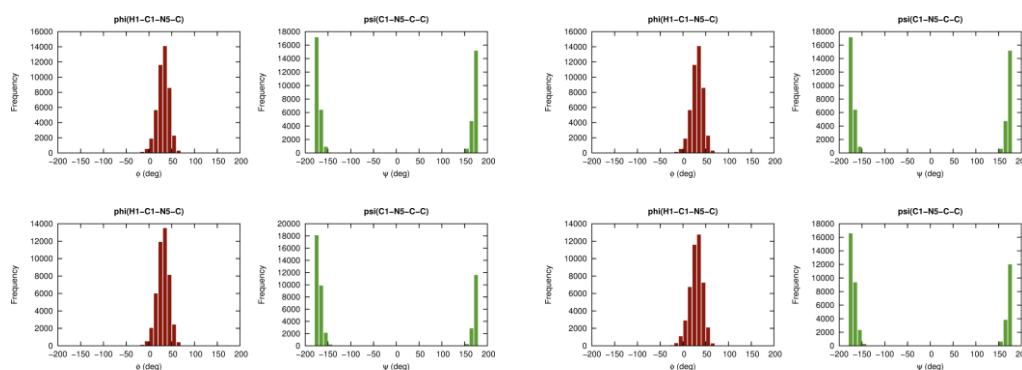


Figura 4.28. Distribución de frecuencia de los ángulos de torsión glicosídicos ϕ y ψ de **1-4** encontrados durante las simulaciones de DM de 9 ns en agua explícita a 25 °C.

Este hecho está de acuerdo con los valores de ángulos de torsión más frecuentemente encontrados para la unión azúcar-Asn presente en los glico-péptidos^[19] o en las glico-proteínas depositadas en el PDB.^[20] No se apreciaron diferencias en los ángulos de torsión entre las distintas glico-oligoamidas **1-4**. Dichos ángulos también están de acuerdo con los valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-5, H-1}}$ medidas y nOes detectados experimentalmente.

- **Interacciones CH- π .** El establecimiento de interacciones CH- π ha sido detectado experimentalmente merced al apantallamiento observado para los protones de la cara α de los derivados de manosa y talosa en presencia del anillo de indol. En los cálculos de DM se ha investigado la distancia entre los protones H-1, H-2 y H-3 de **1-4** y el sistema indol durante 9 ns. Así, se midieron las distancias clave desde el centro de masas (M) de los anillos de 5 miembros (Ind5R) y 6 miembros (Ind6R) del indol a esos protones. La figura muestra claramente que a lo largo de la DM, las distancias H-1 – Ind5R, H-2 – Ind5R, H-2 – Ind6R y

H-3 – Ind6R fueron siempre inferiores a 4 Å^[21] en **1** y **2**. No ocurrió lo mismo para los isómeros **3** y **4**. (Ver figura 4.29).

Además se midió el ángulo entre el vector C-H del azúcar y el vector H-M de la unidad de indol. Los valores de los ángulos obtenidos fueron los esperados para aquellos CHs involucrados en interacciones CH- π siempre mayores a 120°.^[21]

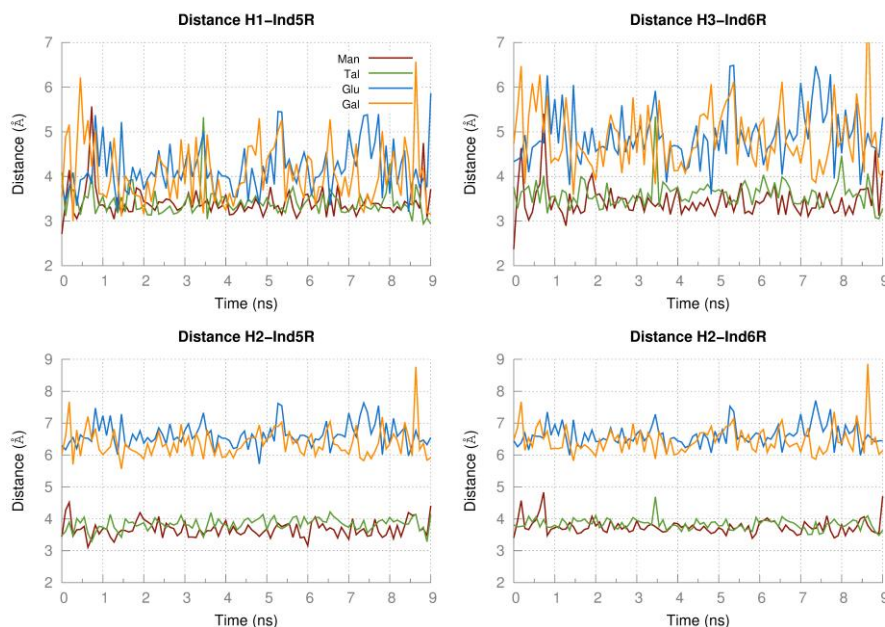


Figura 4.29 Representación de las distancias obtenidas H-1 – Ind5R, H-2 – Ind5R, H-2 –Ind6R y H-3 – Ind6R de las simulaciones de DM en agua explícita a – 25 °C para las diferentes glico-oligoamidas **1-4**.

Por lo tanto, la combinación de estos datos con los experimentales, permitió corroborar la presencia de interacciones carbohidrato-aromático entre los protones H-1, H-2 y H-3 del azúcar y el anillo de indol.

La diferencia obvia entre los derivados **1-2** y sus correspondientes epímeros **3-4** es la configuración absoluta en el centro C-2 del azúcar. Así, hay una preferencia en la manera de cómo el azúcar se presenta ante el residuo aromático del indol. Los datos experimentales y computacionales descritos han mostrado que para β -D-Man (**1**) y β -D-Tal (**2**), la cara α del azúcar está apuntando hacia el indol, mientras que, para β -D-Glc (**3**) y β -D-Gal (**4**) no hay una clara definición de la cara del azúcar respecto del indol. Esta particular característica estructural se refleja claramente en la detección de nOes inter-hebra como el que existe entre

H-2 del azúcar y el Ind-3 de la unidad de indol. Este nOe, fuerte, fue detectado sólo para las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**. La figura 4.30 muestra cómo la distancia H-2 – Ind-3 cambia cuando se comparan **1-2** con **3-4**.

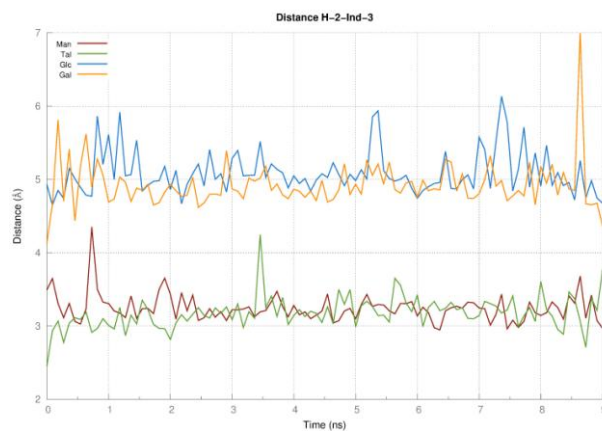


Figura 4.30. Distancia H-2 – Ind-3 obtenida en la simulación de DM de 9 ns en agua explícita a 298K para las diferentes estructuras de las glico-oligoamidas **1-4**.

4.3.2. Cálculos *ab initio*.

La presencia de las interacciones CH- π ha sido demostrada además mediante cálculos *ab initio*. Se llevaron a cabo las estimaciones de la función de densidad electrónica de modelos simples de manosa y talosa **A-B**, así como de los complejos **C-D**. (ver figura 4.31), seguidas por la caracterización de la topología de la densidad electrónica usando la teoría de “Atoms in Molecules”^[22] (AIM). Los modelos simples de manosa y talosa elegidos (**A-D**) sólo incluyeron las unidades de azúcar y una unidad acetamida, reemplazando al pirrol. Se eligieron como modelos aislados Man-NHCOCH₃ (**A**) y Tal-NHCOCH₃ (**B**) y como complejos modelo Man-NHCOCH₃/Indol (**C**) y Tal-NHCOCH₃/Indol (**D**), (ver Figura 4.31). En concreto, se realizaron cálculos de energía puntual sobre los modelos simples modificados a partir de las geometrías de DM, usando el nivel de teoría MP2/6-311++G(2d,2p) para conseguir la función de densidad electrónica.

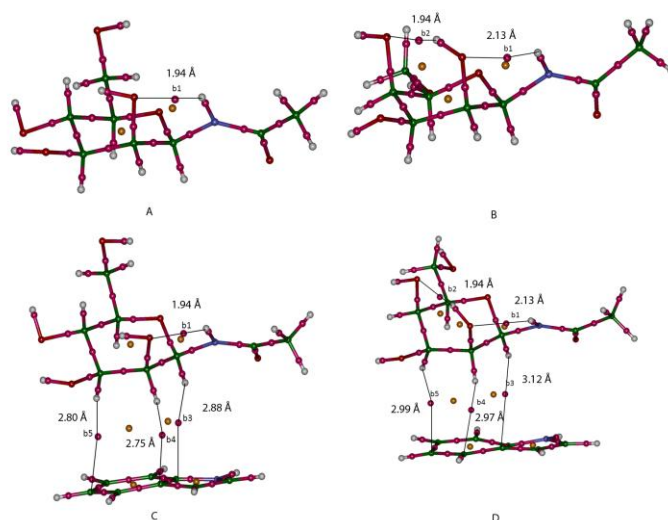


Figura 4.31. Cálculos de AIM de energía puntual (“single point”, SP) para los modelos A-C preparados a partir de los cálculos de DM. La optimización de su geometría y los cálculos de energía SP se llevaron a usando un nivel de teoría MP2/6-311++G(2d,2p). Se muestran las distancias para las interacciones de EH y CH- π y los puntos críticos de enlace (b3-b5) y de anillo (b1 y b2).

Es importante decir que las distancias entre el pirrol y los anillos de azúcar así como la orientación del indol y la amida y grupos hidroxilo no fueron modificadas respecto de los obtenidos en los cálculos de DM.

El complejo Man-NHCOCH₃/Indol muestra tres interacciones CH- π involucrando a H-1, H-2 y H-3 de la manosa (complejo C de la figura 4.31) con sus correspondientes puntos críticos (b3-b5) siendo las distancias entre el azúcar y el anillo aromático muy cortas (entre 2.7 y 2.8 Å). Esto hecho está de acuerdo con la existencia de interacciones de stacking. No obstante, los valores de la densidad electrónica estimada, ρ , para estas interacciones fueron un orden de magnitud más bajo que los correspondientes a los EHs. (Ver tabla 4.13).

Tabla 4.13. Valores de densidad electrónica ρ (ρ) y puntos críticos para los modelos **A-D**.

Compuesto	Punto crítico de enlace	Rho
A	b1	2.567241E-02
B	b1	2.013671E-02
	b2	2.738964E-02
C	b1	2.566960E-02
	b3	7.352334E-03
	b4	8.681815E-03
	b5	7.003472E-03
D	b1	2.014529E-02
	b2	2.739212E-02
	b3	3.551742E-03
	b4	4.606320E-03
	b5	5.140196E-03

Se obtuvieron resultados análogos para el complejo de talosa, Tal-NHCOCH₃/Indol (**D**). Los cálculos mostraron puntos críticos b3-b5 claros, así como distancias cortas entre los hidrógenos H-1, H-2 y H-3 del azúcar y el anillo de indol. Además, también se observaron puntos críticos evidentes para la red de EH intramoleculares NH-5...OH-2...OH-4. Estas evidencias apoyan que las interacciones CH- π proporcionan estabilización a los complejos modelo **C** y **D** así como la estructura en horquilla de **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**. Esta estabilización apuntaría postular la posible existencia de una influencia entre las interacciones CH- π y los EHs intramoleculares.^[17]

4.4. Conclusiones.

- El análisis conformacional de las glico-oligoamidas **1-4** ha mostrado que dichos derivados presentan una estructura de horquilla bien definida en disolución acuosa.
- Se ha comprobado el papel que juega la orientación del hidroxilo en C-2 para modular la conformación de las glico-oligoamidas **1-4**. Así, las medidas de desplazamientos químicos inducidos y la detección de nOes, han confirmado que las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**, con el OH-2 en configuración axial, tienen una estructura de horquilla mejor definida que las glico-oligoamidas con el OH-2 en configuración ecuatorial.
- El análisis de los desplazamientos químicos de los experimentos de ¹H-RMN, constantes de acoplamiento y picos de cruce nOe, ha determinado que las glico-oligoamidas con OH-

2 axial poseen una conformación de enlace amido-glicosídico *Z-anti*, un sentido de plegamiento C–N que orienta la cara α del carbohidrato hacia el indol, y los centros C2 y C3 del carbohidrato hacia el arco NH de la glico-oligoamida. Dicho plegamiento se corresponde con la Estructura A de la figura 4.14 de este capítulo y del esquema 1.1, (página 48), del capítulo 1.

- Por el contrario, las glico-oligoamidas con el OH-2 ecuatorial, con la misma conformación *Z-anti* alrededor del enlace amido-glicosídico y con los mismos centros C2 y C3 del carbohidrato orientados hacia el arco NH, adoptan un plegamiento N–C. Dicho plegamiento se corresponde con la Estructura B de la figura 4.14 de este capítulo y del esquema 1.1, (página 48), del capítulo 1.
- Las simulaciones de DM y los cálculos *ab initio* apoyan los datos experimentales en disolución confirmando que la estructura de horquilla de **1** y **2** está estabilizada por interacciones CH- π .
- Se ha desarrollado una estrategia general para la formación de centros dadores de EH cooperativos y se han caracterizado las correspondientes redes de EH intramoleculares en disolución acuosa mediante RMN.
- En particular, se han creado centros dadores de EH cooperativos OH-2 y OH-4 en las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**, respectivamente mediante la formación de redes de EH intramoleculares NH-5...OH-2 en **β -D-Man (1)** y NH-5...OH-2...OH-4 en **β -D-Tal (2)** en agua. Estas redes se han caracterizado mediante RMN. Así, OH-2 y OH-4 pueden comportarse como centros dadores de EH cooperativos en procesos intermoleculares adicionales.
- Se ha demostrado la existencia de redes de EH intramoleculares en los derivados **1** y **2** mediante simulaciones de DM.
- La combinación de las evidencias experimentales y teóricas apoyan la existencia simultánea de interacciones π - π , CH- π y EHs en estos ligandos de ADN.

Como conclusión, la formación de redes de EH intramoleculares en los ligandos de manosa **1** y talosa **2**, junto con la existencia de interacciones CH- π fuerte en dichos derivados nos ha permitido proponer la existencia de una influencia favorable de una interacción sobre la otra.

4.5. Referencias.

- [1] (a) Chaires, J. B. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 135-151; (b) Diehl, C.; Engström, O.; Delaine, T.; Håkansson, M.; Genheden, S.; Modig, K.; Leffler, H.; Ryde, U.; Nilsson, U. J.; Akke, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14577-14589.
- [2] (a) de Clairac, R. P. L.; Geierstanger, B. H.; Mrksich, M.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7909-7916; (b) Hawkins, C. A.; de Clairac, R. P.; Dominey, R. N.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5235-5243.
- [3] (a) Martin, J. N.; Munoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Canada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518-9533; (b) Souard, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, Juan L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435-2442.
- [4] Dr. Rafael del Villar Guerra, Tesis Doctoral, "Miméticos de Factores de Transcripción: Herramientas químicas para el estudio de modificaciones post-traduccionales de proteínas nucleares que interaccionan con ADN".
- [5] Wemmer, D. E.; Dervan, P. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 355-361.
- [6] (a) Espinosa, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2330; (b) Honda, S.; Honda, N.; Kobayashi, E.; Munekata, S.; Honda J. *Mol. Biol.* **2000**, *295*, 269-278.
- [7] Asensio, J. L.; Ardá, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 946-954.
- [8] Reyes Babiano, M. A.; Carretero, M. J.; Cintas, P.; Higes, F. J.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C. *Tetrahedron.* **1998**, *54*, 615-628.
- [9] Avalos, M.; Babiano, R.; Barneto, J. L.; Bravo, J. L.; Cintas, P.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7275-7282.
- [10] , E. M.; Lundqvist, L. C. E.; Jouanneau, D.; Helbert, W.; Sandstrom, C. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3487-3494; (b) Bekiroglu, S.; Kenne, L.; Sandström, C. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2465-2468; (c) Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 809-815.
- [11] (a) Poppe, L.; Stuike-Prill, R.; Meyer, B.; van Halbeek, H. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 109-136; (b) Poppe, L. V. H., *H Nature Struct. Biol.* **1994**, *1*.
- [12] Fraser, R. R. K., M.; Morand, P.; Govil, G. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 403.
- [13] Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z.; Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547-8561.
- [14] Nestor, G.; Kenne, L.; Sandstrom, C. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2795-2802.
- [15] Vijay, D.; Zipse, H.; Sastry, G. N. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*, 8863-8867.
- [16] (a) Bravaya, K. B.; Kostko, O.; Ahmed, M.; Krylov, A. I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 2292-2307; (b) Leist, R.; Frey, J. A.; Ottiger, P.; Frey, H.-M.; Leutwyler, S.; Bachorz, R. A.; Kloppe, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7449-7452; (c) Mignon, P.; Loverix, S.; Steyaert, J.; Geerlings, P. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1779-1789.
- [17] (a) Karimi, P.; Ebrahimi, A.; Bazzi, S. *J. Iran. Chem. Soc.* **2012**, *9*, 991-998; (b) Mohamed, M. N. A.; Watts, H. D.; Guo, J.; Catchmark, J. M.; Kubicki, J. D. *Carb. Res.* **2010**, *345*, 1741-1751.
- [18] Jeffrey, G. A. *Hydrogen Bonding in Biological Structures* Springer-Verlag, **1991**.
- [19] Hernández-Gay, J. J. A., A.; Eller, S.; Mezzato, S.; Leeflang, B. R.; Unverzagt, C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10715-10726.
- [20] Calculated with Glytortion (<http://www.glycosciences.de/tools/>); Lütke, T. F., M.; von der Lieth, C.-W. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D242.
- [21] Tayubi, I. A. S., R. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, *3*, 212-218.
- [22] Bader, R. F. W. *A Quantum Theory.*; Clarendon Press., **1990**.

5. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE LAS GLICO-OLIGOAMIDAS CON POLÍMEROS DE ADN MEDIANTE RMN.

El objetivo de este capítulo es obtener información acerca del papel que juega el fragmento de carbohidrato de las glico-oligoamidas en el proceso de interacción con polímeros de ADN mediante el uso de RMN. En concreto se tratará de estudiar la influencia de las redes de EH intramoleculares de las glico-oligoamidas que contienen carbohidratos tanto de la serie D como de la serie L en la interacción con polímeros de ADN tanto a nivel de afinidad como estructural.

En este capítulo se incluye un primer apartado, (apartado 5.1), de análisis estructural de las nuevas glico-oligoamidas **β -D-Man (1)**, **β -D-Tal (2)**, **β -L-Man (7)**, **β -L-Gal (8)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** por RMN en H₂O a 5 °C^a y D₂O a temperatura ambiente. El objetivo es determinar la conformación de las nuevas glico-oligoamidas en las mismas condiciones experimentales de disolvente y temperatura utilizadas en los estudios de interacción con polímeros de ADN.

5.1. Estudios estructurales de las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)**, **β -D-Tal (2)**, **β -L-Man (7)**, **β -L-Gal (8)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** en H₂O a 5 °C y en D₂O a 25 °C.

Como ya se comentó en el capítulo 4, el conocimiento de la estructura de los ligandos en el estado libre en disolución acuosa juega un papel importante en procesos de reconocimiento molecular.

En primer lugar, se asignaron las resonancias de los protones en los espectros de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** mediante experimentos de RMN mono y bidimensionales en H₂O a una temperatura de 5 °C usando un capilar externo de D₂O para evitar el intercambio de deuterio con los protones amídicos y hidroxilo de las glico-oligoamidas. Las tablas en las que se muestra dicha asignación se encuentran en el Anexo de esta tesis. (Ver tablas 9.1, 9.2 y 9.3 del Anexo). Tras la asignación de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas **1, 2** y **7-9** en H₂O a 5 °C, se llevó a cabo la asignación de las

^a Los experimentos de RMN realizados en H₂O a 5 °C fueron necesarios para la detección de los protones NH amídicos intercambiables que contribuyen a la asignación del resto de los protones de las glico-oligoamidas tanto a 5 °C como en D₂O a 25 °C.

resonancias de los protones de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en D₂O a 25 °C. (Ver tablas 9.4, y 9.5 del Anexo).

Se realizaron experimentos NOESY y ROESY^b para obtener información sobre la conformación. En dichos experimentos realizados en H₂O a 5 °C se han encontrado nOes intra-hebra comunes a todas las glico-oligoamidas entre los protones amídicos y los protones en posición 3 de los pirroles que caracterizan la forma arqueada de las glico-oligoamidas. (Ver figura 4.12, capítulo 4).

Por otro lado, los picos de cruce obtenidos en los experimentos NOESY de nuestros ligandos en general poco intensos y negativos han apuntado a que el efecto nOe en las moléculas objeto de estudio en esta tesis esta próximo al nOe cero.^[2b] Por lo tanto, nos hemos centrado en el análisis de experimentos ROESY, que resultó ser el más adecuado, para el estudio estructural de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9** en disolución acuosa.

Como podemos observar, en la figura 5.1, para todas las glico-oligoamidas con OH-2 en configuración axial se encontraron tanto nOes inter-hebra pirrol/pirrol como nOes carbohidrato/indol en H₂O con capilar externo de D₂O a 5 °C. Así, en las glico-oligoamidas **β-D-Man (1)**, **β-D-Tal (2)**, **β-L-Man (7)** y **6-desoxy-β-D-Man (9)**, es la cara α del carbohidrato la que queda próxima al indol. En el caso de la **β-L-Gal (8)** no pudo definirse la cara cercana al anillo de indol.

^b En condiciones de alta movilidad los incrementos de NOE y ROE máximos son iguales. Sin embargo, al reducirse la movilidad el nOe cambia de signo (pasando de positivo a negativo) mientras que el ROE permanece positivo y se incrementa ligeramente. Los nOes en el espectro ROESY no se hacen nunca negativos, (siempre son de signo opuesto a los de la diagonal), independientemente del valor del tiempo de correlación τ_c y de aquí su gran utilidad: permiten determinar vecindad espacial entre moléculas de movilidad intermedia.^[1] Así, para moléculas de tamaño medio (Pm = 1000 - 3000) nos encontramos cerca de nOe cero y el experimentos ROESY^[2] es el más apropiado.

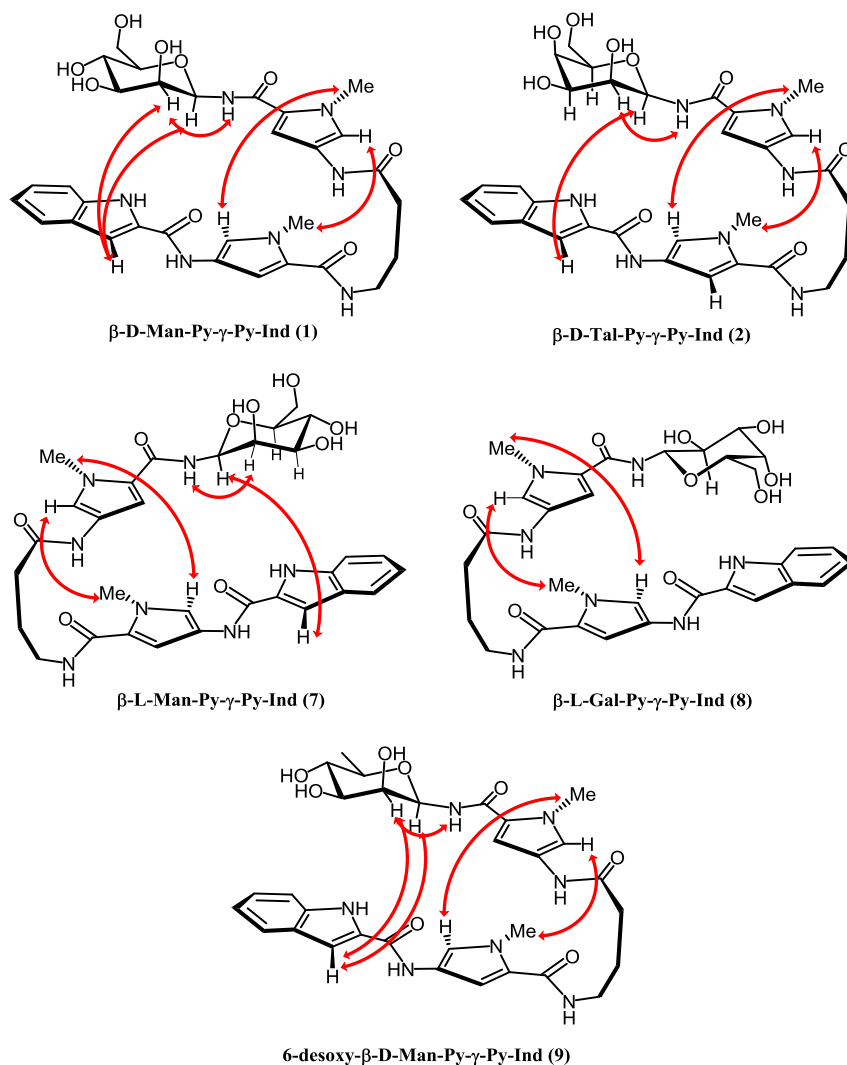


Figura 5.1. Representación de los nOes inter-hebra encontrados en los espectros ROESY para las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en H₂O con capilar externo de D₂O a 5 °C.

Los valores de constante de acoplamiento $J_{\text{NH5/H1}} \sim 9$ Hz, nOe NH-5/H-2 y nOes intrahebra entre los NHs amídicos y los protones en posición 3 de los anillos aromáticos (NH-5/Py-3^B), nos han permitido determinar la estructura de las glico-oligoamidas.

Si tenemos en cuenta las posibilidades conformacionales en el estado libre propuestas en los esquemas 1.1 y 1.3 del capítulo 1 (página 49 y 53 respectivamente) podemos decir que: las glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie D, (**1**, **2** y **9**), en el estado libre en disolución acuosa a 5 °C se corresponden con la estructura A de los esquemas 1.1 y 1.3. Esta estructura presenta un sentido de plegamiento de la horquilla N-C donde la cara α del

carbohidrato está próxima al indol y los centros C2, C3 del azúcar se orientan hacia el arco NH. (Ver figura 5.2, izquierda).

Sin embargo, la glico-oligoamida de **L-Manosa (7)** se corresponde con una estructura A' de los esquemas 1.2 y 1.3, (capítulo 1, páginas 51 y 53 respectivamente). Dicha estructura se caracteriza por un sentido de plegamiento C→N, cara α del carbohidrato próxima al indol y centros C2, C3 del carbohidrato orientados hacia el arco NH. (Ver figura 5.2, derecha).

Así, la diferencia entre la estructura A y A' la encontramos en el diferente plegamiento de la horquilla: sentido N→C para glico-oligoamidas con OH-2 en configuración axial de la serie D y sentido C→N para glico-oligoamidas con OH-2 en configuración axial de la serie L. (Ver figura 5.2).

En la figura 5.2, se resumen las características estructurales de **β -D-Man (1)**, **β -D-Tal (2)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)**, (figura 5.2, izquierda) y **β -L-Man (7)**, (figura 5.2, derecha).

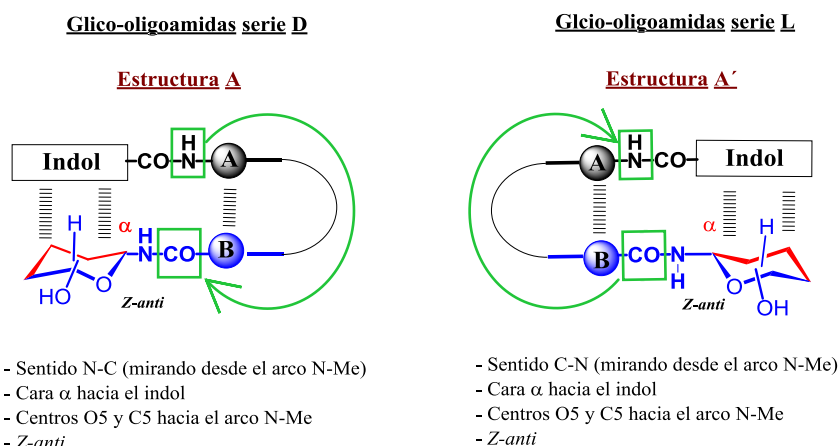


Figura 5.2. Tipo de plegamiento, (mirando desde el arco N-Me), cara cercana al indol y orientación de los centros del carbohidrato en las glico-oligoamidas con carbohidratos de la serie D: **1, 2 y 9** (izquierda) y de la serie L: **β -L-Man (7)**, (derecha).

En la figura 5.3, se representan las glico-oligoamidas **1, 2 y 7-9** de forma que los NHs y los centros C2 y C3, (en rojo), del carbohidrato quedan orientados hacia el arco NH y los metilos, (en azul), y centros O5 y C5 del carbohidrato lo hacen hacia el arco N-Me. Por lo tanto, podemos decir que, en todos los casos, en las glico-oligoamidas con OH-2 en configuración axial el centro dador de EH cooperativo OH-2 queda orientado hacia el arco NH de la glico-oligoamida en el estado libre en disolución acuosa. (Ver figura 5.3).

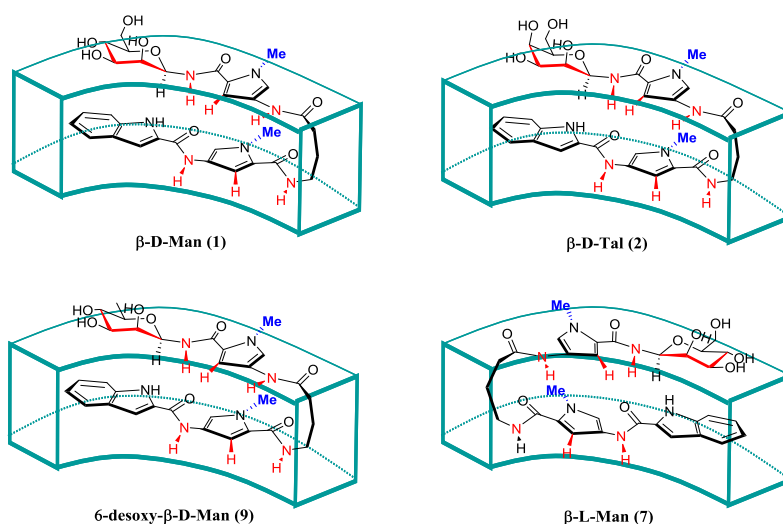
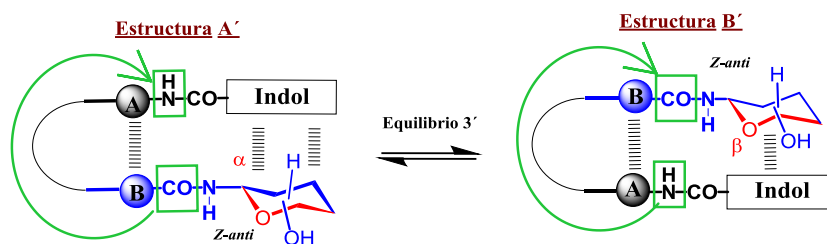


Figura 5.3. Representación de la conformación de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9**.

En el caso de **β -L-Gal (8)** no se pudo determinar el tipo de plegamiento de la estructura por no encontrarse nOes interhebra carbohidrato indol, aunque sí se pudieron definir los centros del carbohidrato O5 y C5 orientados hacia el arco N-Me de acuerdo a un valor de ~ 9 Hz de la constante de acoplamiento y al nOe encontrado NH-5/H-2 que indican una conformación *Z-anti* del enlace amido-glicosídico. Por lo tanto, para **β -L-Gal (8)** tenemos dos opciones de plegamiento posibles correspondientes a las estructuras A' y B' donde los centros C2 y C3 se encuentran en el arco N-H siendo N \rightarrow C el plegamiento en la estructura A' (con la cara α hacia el indol) y C \rightarrow N el plegamiento en B' con la cara β próxima al indol. (Esquema 5.1).



Esquema 5.1. Equilibrio entre las posibles formas de estructura en horquilla de la glico-oligoamida β -L-Gal (8).^c

En los estudios estructurales realizados a temperatura ambiente se encontró una estructura en horquilla para todas las glico-oligoamidas, caracterizada por los nOes interhebra pirrol/pirrol, en el estado libre en D₂O. Sin embargo, la ausencia de nOes carbohidrato indol y nOes que involucran a los NH amídicos impidió la determinación del sentido del plegamiento, así como la definición de los centros del carbohidrato orientados hacia el arco NH. (Ver figura 5.4).

^c Estudios previos en nuestro grupo pusieron de manifiesto la estructura en horquilla de la glico-oligoamida β -D-Gal (4) por la existencia de nOes inter-hebra entre las unidades de pirrol. Sin embargo no fue posible definir los centros del carbohidrato orientados hacia el arco NH ni la cara del carbohidrato más próxima al indol.

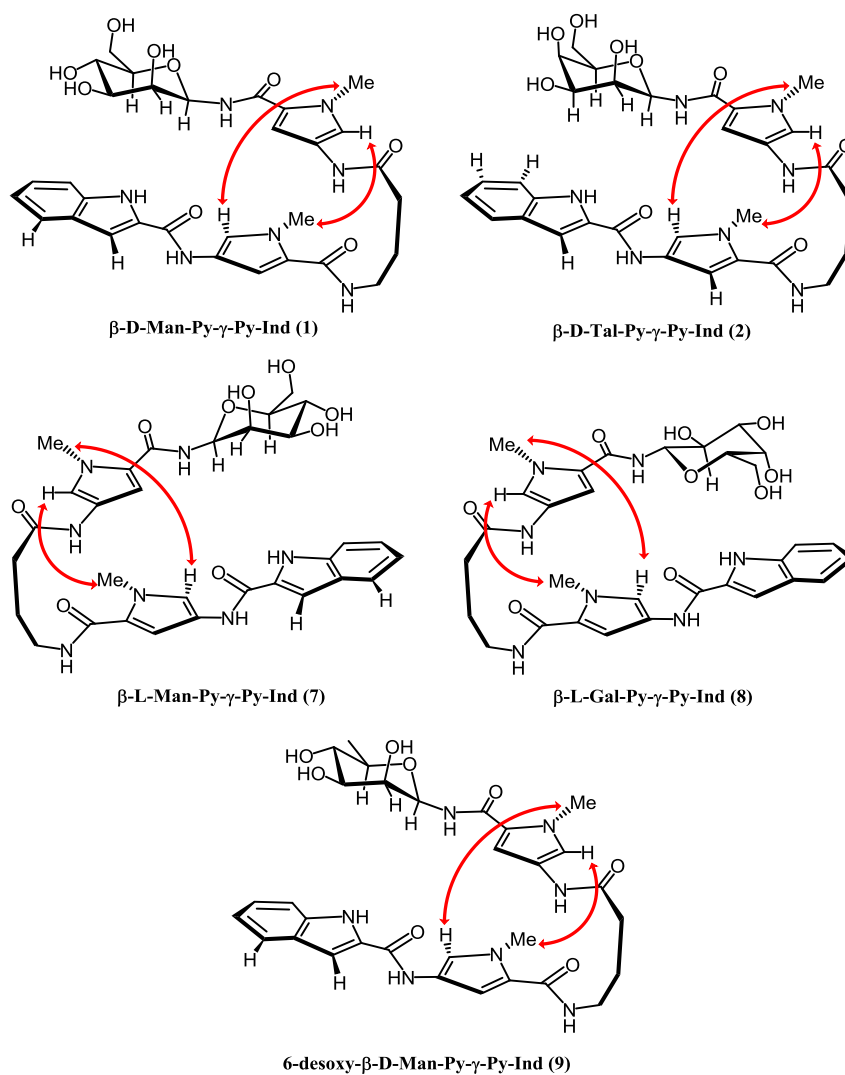


Figura 5.4. Representación esquemática de los nOes inter-hebra encontrados en los espectros ROESY para las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en D₂O a 25 °C.

Después de determinar que las nuevas glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** tienen estructura en horquilla en D₂O a temperatura ambiente pasamos a estudiar las propiedades de interacción de las mismas con el ADN.

5.2. Estudios de interacción de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** con diferentes polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

Como primera aproximación al estudio de la interacción de las glico-oligoamidas con el ADN se han seleccionado dos tipos de polímeros: ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

El ADN de timo de bovino (ct-ADN) es un polímero de secuencia aleatoria y composición 60% pares de bases AT y 40 % GC.^[3] Por otro lado, el poly(dA-dT)₂ es un polímero de ADN con un 100% de pares de bases AT y con una secuencia -(AT)_n.

El uso de polímeros de ADN como punto de partida para explorar la capacidad de unión de ligandos naturales del ADN,^[4] o de nuevos ligandos diseñados,^[5] ha sido esencial para obtener los parámetros cinéticos y termodinámicos del proceso de reconocimiento, usando diversas técnicas, como la fluorescencia o la calorimetría.^[6] Estos polímeros de ADN, de secuencia aleatoria o definida, han sido modelos muy útiles para definir también la selectividad de la unión de los ligandos por secuencias específicas de ADN,^[3,4e,7] y han permitido diseñar secuencias cortas de oligonucleótidos con unas propiedades definidas, y obtener detalles estructurales, a escala atómica, de su modo de interacción con distintos ligandos.

En este sentido, como primera aproximación al estudio de interacción de las glico-oligoamidas-ADN, el *calf thymus* ADN (ct-ADN) es un sistema idóneo, ya que contiene un número elevado de pares de bases cuya combinación en la doble hélice da lugar, a su vez, a un gran número de secuencias diferentes, posibles diana de los ligandos objeto de estudio.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica altamente sensible para detectar interacciones de compuestos que se unen a macromoléculas.^[8] Los polímeros de ADN (ct-ADN) y poly(dA-dT)₂ son macromoléculas y como tal presentan propiedades físicas características que la diferencian de moléculas más pequeñas. Debido a sus movimientos rotacionales y traslacionales lentos los parámetros de RMN que dependen de las propiedades de relajación dipolar y de difusión traslacional son muy diferentes de las moléculas orgánicas pequeñas. En estas condiciones, es posible distinguir entre el ADN polimérico y ligandos libres, así como diferenciar entre el estado libre y asociado del ligando. Los experimentos de RMN empleados para este fin se basan en las diferencias existentes en las velocidades de relajación, en efectos nOe y en la transferencia de saturación entre ligando y macromolécula. (Ver figura 5.5).

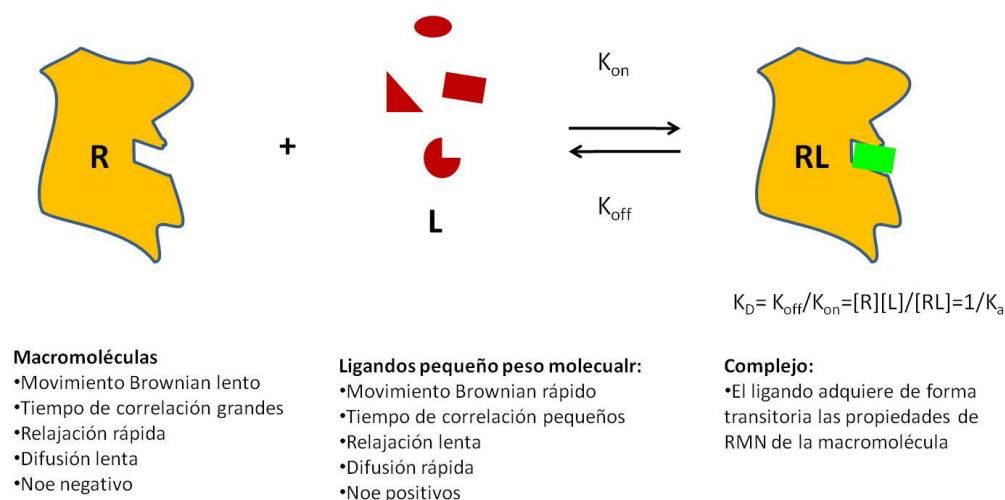


Figura 5.5. Propiedades físicas cuando un ligando de pequeño peso molecular se asocia a una macromolécula.

Así, las moléculas de pequeña masa molecular (<2000 Da) están caracterizadas por tener pequeñas velocidades de relajación (R_1 y R_2), anchuras de líneas pequeñas (1-5 Hz), picos de cruce en el espectro 2D-NOESY positivos (distinto signo que la diagonal) o ligeramente negativos, pequeños tiempos de correlación ($\tau_c \sim \text{ps}$) y grandes coeficientes de difusión. En cambio, las macromoléculas, de peso molecular alto, como proteínas y polímeros de ácidos nucleicos, se caracterizan por tener grandes velocidades de relajación (R_1 y R_2), señales de resonancia muy ensanchadas, picos de cruce en el espectro 2D-NOESY negativos, (mismo signo que la diagonal), grandes tiempos de correlación ($\tau_c \sim \text{ns}$) y pequeños coeficientes de difusión. Además, en condiciones de generación de efecto nOe, la magnetización se transmite rápidamente por difusión de spin a lo largo de la macromolécula.^[8b,9]

Como resultado de esto, los parámetros de RMN de moléculas de pequeña masa molecular (<2000 Da) son muy sensibles a la interacción con macromoléculas. Es bien conocido que los cambios en los valores de las anchuras de línea, velocidades de relajación, y nOes se pueden usar para caracterizar y cuantificar la unión de moléculas pequeñas a macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, micelas e incluso a estructuras celulares.^[10]

Estos parámetros de RMN son muy sensibles a la hora de distinguir entre los estados libre y complejo de un ligando. Además, si la molécula es muy grande, la relajación es muy efectiva e incluso es posible que sus resonancias desaparezcan en el espectro de ^1H -RMN, ya que la anchura de línea es inversamente proporcional al tiempo de relajación transversal (T_2).

De esta manera, cuando un ligando se asocia a una macromolécula, sus propiedades de movimiento se asemejan a los de ésta y sus propiedades de RMN también. Por tanto, los núcleos activos a la RMN del mismo se relajan rápidamente en el estado asociado, (se ensanchan e incluso desaparecen), y los efectos nOe crecen y se transmiten velozmente.^[11] Además, al adquirir la molécula pequeña velocidades de relajación transversal más grandes eso se traduce en un ensanchamiento de las señales de resonancia de la molécula pequeña.^[12]

Así, la fracción de ligando unido y el tamaño de la macromolécula están directamente correlacionados con los cambios en la anchura de línea^[13] de forma que, a medida que aumenta el tamaño de la macromolécula aumenta la sensibilidad de estos experimentos.^[14] Por ejemplo, para ligandos que se unen a una proteína pequeña con constantes de asociación débiles ($1-10^3 \text{ M}^{-1}$), es difícil de obtener datos de ensanchamientos de línea reproducibles y fiables, mientras que la unión a proteína grandes (mayor de 60 kDa) con una misma afinidad para el ligando, los cambios en la anchura de línea son fácilmente detectables.^[14b,15]

Un método sencillo para detectar la interacción de un ligando (o mezcla de ligandos) a una macromolécula es la adquisición de un espectro de ^1H -RMN del ligando en ausencia y en presencia de la macromolécula, a partir de los cuales se pueden determinar las diferencias en la forma de línea y velocidades de relajación. El aumento de la relajación transversal de las resonancias de un ligando, (relacionado con la anchura de línea), después de la adición de una macromolécula es indicativo de la formación de un complejo, esto se traduce en un ensanchamiento y una disminución de la intensidad de la señal de ^1H -RMN del ligando.^[11,14b,16]

Nosotros hemos abordado el estudio de interacción de glico-oligoamidas con polímeros de ADN haciendo uso de experimentos de ^1H -RMN mediante el análisis de la anchura y la intensidad de la señal del ligando al producirse la unión.

5.2.1. Unión al surco menor del ADN. Experimento de competición con Netropsina.

El objetivo de este apartado es determinar si las nuevas glico-oligoamidas **β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9)**, objeto de estudio de esta tesis, son ligandos del surco menor del ADN.

Estudios previos en nuestro grupo han puesto de manifiesto que las glico-oligoamidas anteriormente sintetizadas son ligandos del surco menor del ADN mediante experimentos de competición con netropsina (conocido ligando del surco menor del ADN). Estos experimentos

de competición han servido para determinar que las glico-oligoamidas comparten sitios de unión con la netropsina y que por lo tanto, son también ligandos del surco menor del ADN.^[16]

En esta tesis, se han llevado a cabo experimentos de competición entre la netropsina y cada una de las nuevas glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** con ct-ADN, como veremos a continuación.

En un experimento de valoración con polímeros de ADN por ¹H-RMN, si existe asociación al ADN, los núcleos de las nuevas glico-oligoamidas sentirán el efecto de la macromolécula y sus resonancias se ensancharán o incluso, desaparecerán, dependiendo de diversos factores tales como: la relación molar receptor/ligando, de la constante de asociación, de la cinética del proceso y de la masa molecular del ADN utilizado.^[13] Si la netropsina y las glico-oligoamidas comparten sitios de unión en el surco menor del ADN, el antibiótico podría desplazarlos de un complejo preformado glico-oligoamida-ADN.

Así, se llevaron a cabo experimentos de competición entre las glico-oligoamidas y la netropsina con el ct-ADN siguiendo el protocolo de valoración por ¹H-RMN anteriormente utilizado en nuestro grupo de investigación.^[16]

El protocolo experimental seguido consiste en preparar 500 μ L de una disolución de la glico-oligoamida a estudiar ($c \approx 10^{-4}$ M) en D₂O tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄, pH=7.2) a 25°C. Sobre esta disolución se añaden cantidades crecientes de una disolución de ct-ADN ($c \approx 3$ mM) y ligando ($c \approx 10^{-4}$ M) al tubo de RMN, hasta la desaparición de las señales aromáticas de la glico-oligoamida en el espectro (ver figura 5.6 A-D). En este punto de la valoración, se considera que gran parte de la glico-oligoamida está complejada con el ADN (figura 5.6 D). A continuación, se añaden cantidades crecientes de una disolución de netropsina $\sim 10^{-2}$ M a la muestra, (figura 5.6 E-F) que contiene el complejo glico-oligoamida-ct-ADN, y se registra un espectro de ¹H-RMN tras cada adición de netropsina.

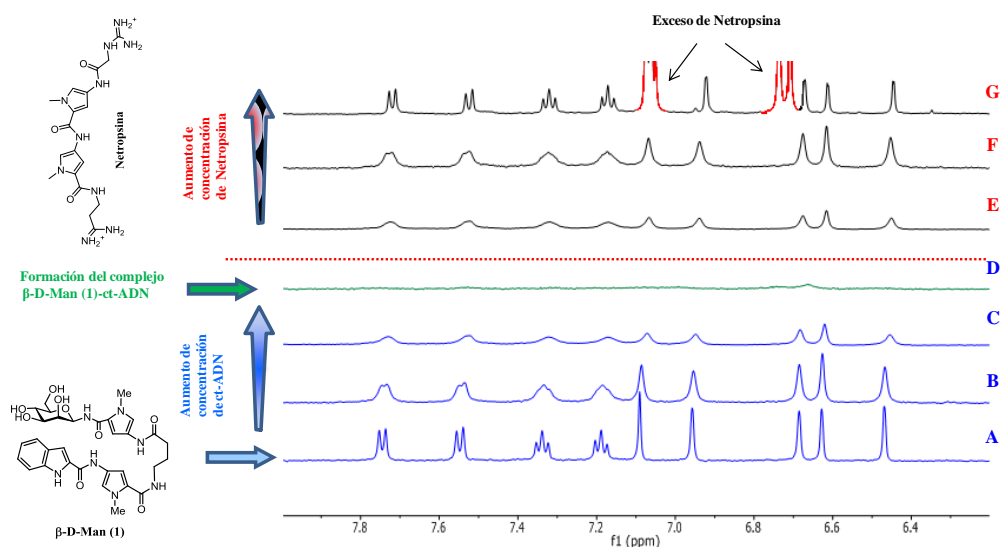


Figura 5.6. Experimento de competición entre la glico-oligoamida de manosa **β-D-Man (1)** y Netropsina con ct-ADN: a) Ampliación de la región aromática del espectro ¹H NMR de **1** (c=200 μM) en ausencia de ADN; b) **1** (c=200 μM) en presencia de 80 μM (bp) de ct-ADN; c) **1** (c=200 μM) en presencia de 1.0 mM (bp) of ct-ADN; d) Formación del complejo: **1** (c=200 μM) en presencia de 5.0 mM bp de ct-ADN; e) **1** (c=200 μM) en presencia de 5.00 mM (bp) de ct-ADN y Netropsina (c=400 μM). Comienzan a aparecer, de nuevo, las resonancias de **1** en el espectro; f) **1** (c=200 μM) en presencia de 5.00 mM (bp) de ct-ADN y Netropsina (c=4 mM); g) **1** (c=200 μM) en presencia de 5.00 mM (bp) de ct-ADN y exceso de Netropsina. Todos los espectros fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s) en D₂O tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

Así, en los espectros, se puede observar la aparición progresiva de las señales correspondientes a la glico-oligoamida **β-D-Man (1)**, señal de que la netropsina está desplazando a nuestro ligando del surco menor del ADN (figura 5.6 E-G). Debido a la gran concentración (~5 mM) de ct-ADN utilizada para hacer desaparecer las señales de las glico-oligoamidas, al final del experimento, fue necesario añadir un exceso de netropsina en forma sólida (~1.3 mg), (espectro G), el cual desplaza por completo a la glico-oligoamida de manosa **1** provocando la aparición de todas las resonancias de **1** en el espectro de ¹H-RMN. (Figura 5.6 G). El exceso de netropsina empleado fue necesario ya que dicho ligando es selectivo de secuencias AT y el ct-ADN contiene un 60% de pares de bases AT y 40% de GC.

Por lo tanto, el hecho de que la netropsina desplace por completo a la glico-oligoamida del complejo preformado con ct-ADN, es indicativo de que ambos ligandos comparten sitios de unión en el ADN y constituye una prueba de que las glico-oligoamidas son ligandos del surco menor del ADN al igual que el antibiótico netropsina.

Los experimentos de competición, siguiendo el mismo protocolo, realizados con el resto de los compuestos y netropsina se muestran en el Anexo 9 (ver figuras 9.3, 9.4 y 9.5).

5.2.2. Estudio de la selectividad de secuencia de las glico-oligoamidas por RMN con ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

El objetivo de este apartado es confirmar si las nuevas glico-oligoamidas son selectivas de secuencias AT.

Esta selectividad es la esperada por el tipo de diseño del vector neutro ya que, la pareja de pirroles que se incluyen en la oligoamida es selectiva del par de bases AT según el código de reconocimiento de Dervan.

Así, (como se comentó anteriormente), se seleccionaron dos tipos de ADN polimérico, ct-ADN (60% AT y 40%CG)^[17] y poly(dA-dT)₂, para realizar los estudios de selectividad de secuencia por ¹H-RMN.

Los experimentos que se llevaron a cabo fueron valoraciones de ¹H-RMN del compuesto **β-D-Man (1)** tanto con ct-ADN como con poly(dA-dT)₂ en D₂O (en tampón fosfato 6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. En cada valoración se registró un primer espectro de la disolución de compuesto a una concentración entorno a 200 μM y después se añadieron cantidades crecientes de una disolución de ADN (5.0 mM (bp) de ct-ADN o 6.0 mM (bp) de poly(dAdT)₂) que contiene el ligando en la misma concentración que la disolución a valorar. De esta forma la concentración de ligando durante el experimento se mantiene constante. Tras cada adición de ADN se registró un espectro de ¹H-RMN.

Los espectros de ¹H-RMN de todas las valoraciones presentadas en este trabajo se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz) a 25°C utilizando siempre el mismo número de scans (ns=64) para cada espectro y manteniendo constante el valor de la ganancia del espectrómetro. En todos los experimentos se utilizó un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s), para permitir que los espines vuelvan al equilibrio térmico, condición necesaria para realizar un análisis cuantitativo de la intensidad e integral de las señales a lo largo de la valoración.

La adición de cantidades crecientes tanto de ct-ADN como de poly(dA-dT)₂ sobre una disolución de **β-D-Man (1)** provocó un ensanchamiento progresivo de las resonancias del ligando (ver figura 5.7). Dicho ensanchamiento se tradujo en una disminución progresiva en la intensidad observada de las resonancias. Así, para una misma relación ligando/macromolécula

sufrirán una mayor disminución en la intensidad de las señales de ^1H -RMN los ligandos que presenten una mayor afinidad por la macromolécula.^[14b] De esta manera, la intensidad de la señal se puede correlacionar con la concentración de ligando libre en disolución. Este parámetro, intensidad de señal, ha sido utilizado por otros grupos para la estimación de constantes de asociación entre ligandos y proteínas.^[18]

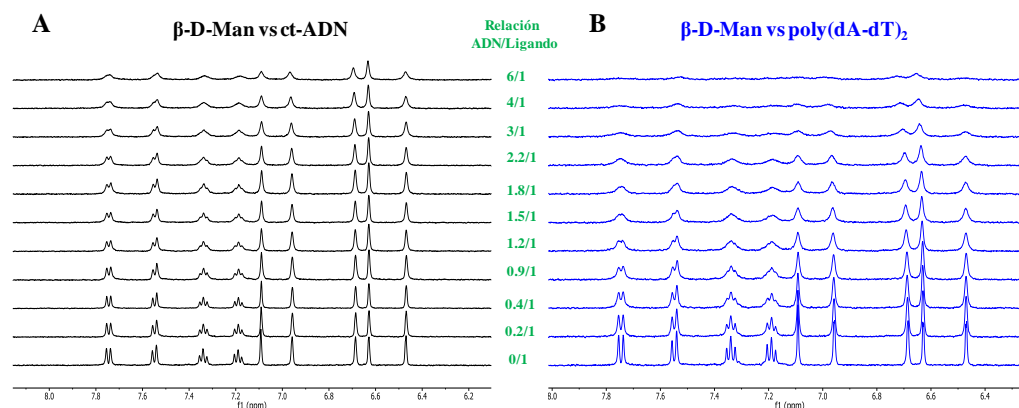


Figura. 5.7. Estudio de selectividad de secuencia de **β -D-Man (1)**. Ampliaciones de los espectros ^1H -RMN (500 MHz) de valoraciones de **β -D-Man (1)** con ct-ADN (A) y con poly(dA-dT)₂ (B) a diferentes relaciones molares de ADN/Ligando (desde 0 hasta 6/1) para ambos complejos.

En la Figura 5.8 se ha representado la dependencia de la intensidad relativa (I_{obs}/I_0)^d de varias resonancias de **β -D-Man (1)** en función de la relación molar (ADN/ligando). En todos los casos se observó una disminución progresiva de las intensidades relativas de las resonancias del ligando al añadir cantidades crecientes de ADN tanto de ct-ADN como de poly(dA-dT)₂.

Así, las resonancias correspondientes a los protones aromáticos desaparecieron por completo al añadir un exceso de poly(dA-dT)₂ (ADN/Ligando=6:1) (Figura 5.7 B y 5.8 B). En cambio, en la valoración con ct-ADN para una relación molar ct-ADN/ligando 6:1 no se observó la desaparición completa de las señales correspondientes a los protones aromáticos. (Figuras 5.7 A y 5.8 A).

^d I_{obs} = Intensidad de la señal de resonancia en presencia de ADN. I_0 = Intensidad de la señal de resonancia en ausencia de ADN.

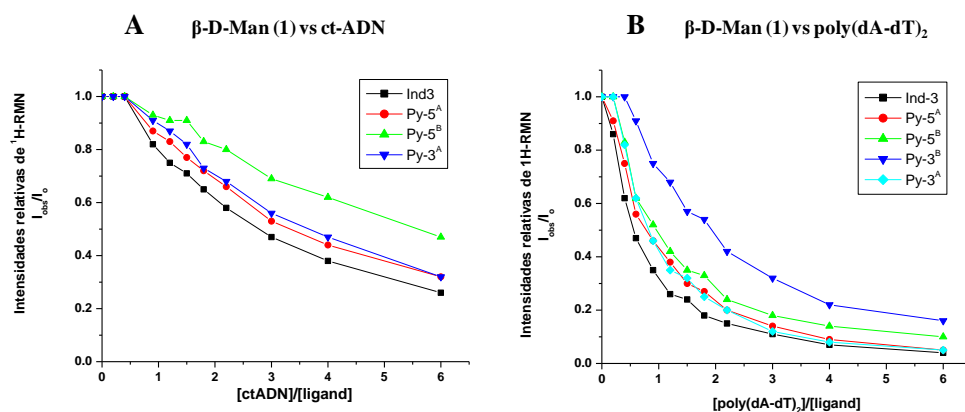


Figura 5.8. Representación de las intensidades relativas (I_{obs}/I_0) de las resonancias de ^1H -RMN (500 MHz) de diferentes protones del ligando **β -D-Man (1)** en función de la relación molar de ADN/Ligando. I_{obs} = Intensidad de la señal de resonancia en presencia de ADN y I_0 = Intensidad de la señal de resonancia en ausencia de ADN. Condiciones: 25°C en D_2O tampón fosfato (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4 , pH=7.2). La concentración de ligando se mantiene constante a lo largo de toda la valoración $[\mathbf{1}]=250 \mu\text{M}$. Referencia TSP-d4 (0.00 ppm, 100 μM).

En la figura 5.8 se observa una disminución de la intensidad, y un ensanchamiento, más rápido de las resonancias correspondientes a la hebra indol (donde se encuentra el pirrol A), que las resonancias de la hebra azúcar (donde se encuentra el pirrol B) tanto con ct-ADN como con $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$. Esto sugiere que los protones de la hebra indol están más próximos al surco menor de ambos polímeros de ADN que los protones de la hebra-azúcar.

Así, debido a que el cambio en la intensidad de la señal a lo largo de la valoración por ^1H -RMN depende en gran medida del peso molecular del ADN utilizado hay que ser muy prudentes con las conclusiones obtenidas a partir de los estudios que utilizan parámetros de RMN que dependen del peso molecular de la macromolécula.^[19]

Cuando sugerimos que las glico-oligoamidas son más selectivas de $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ que de ct-ADN, debemos tener presente que estamos asumiendo lo siguiente:

- Que las propiedades de relajación de los compuestos en el estado asociado tanto a ct-ADN como a $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ son similares, a pesar de las posibles diferencias en peso molecular existentes entre el ct-ADN y el $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$.
- Que la magnitud del efecto que producen ambos tipos de ADN en las velocidades de relajación de los protones del ligando son análogas.

- Las diferencias de desplazamiento químico entre el estado libre y asociado de las glico-oligoamidas son muy parecidas debido a las semejanzas estructurales^[20] de todas las glico-oligoamidas.
- La presencia de un intercambio rápido (por lo que la contribución del intercambio a la anchura de línea es despreciable).

Por otro lado, para descartar que los cambios en la anchura de línea de las resonancias de los compuestos se deban a cambios de viscosidad del medio^[21] se empleó, como referencia interna, TPS-d4 (compuesto que no interacciona con el ADN). (Ver figura 9.6 del anexo).

Así, estamos asumiendo que los cambios observados en la anchura de línea o en la intensidad de las señales de las resonancias de los protones del ligando se atribuyen fundamentalmente al diferente valor de la constante de asociación del ligando con el ADN y la contribución de los anteriores factores no debería influir en el orden de afinidades relativas cuando se utiliza la medida de la intensidad de la señal como aproximación experimental para el cálculo de afinidades.^[18a]

En la figura 5.9 aparece la comparación de la intensidad relativa (I_{obs}/I_0) de las resonancias de ^1H -RMN de los protones Ind-3 (cuadrado) y Py-5^A (círculo) del ligando **β -D-Man (1)** en presencia de ct-ADN (curvas negras) o en presencia de poly(dA-dT)₂ (curvas azules).

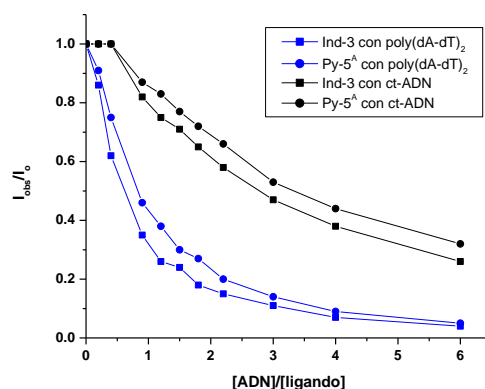


Figura 5.9. Estudio de la selectividad de secuencia de **β -D-Man (1)**. Comparación de la intensidad relativa (I_{obs}/I_0) de las resonancias de ^1H -RMN de los protones Ind-3 (cuadrado) y Py-5^A (círculo) del ligando **β -D-Man (1)** en presencia de ct-ADN (curvas negras) o en presencia de poly(dAdT)₂ (curvas azules). I_{obs} = Intensidad de la señal de resonancia en presencia de ADN y I_0 = Intensidad de la señal de resonancia en ausencia de ADN.

De esta gráfica, se puede deducir que se necesita una menor concentración de poly(dA-dT)₂ que de ct-ADN para hacer desaparecer las señales de los correspondientes protones. Esto sugiere que las glico-oligoamidas se unen con una mayor afinidad a poly(dA-dT)₂ que a ct-ADN.

Por lo tanto, los experimentos de afinidad, que se van a exponer al final de este capítulo, se van a realizar exclusivamente con el polímero poly(dA-dT)₂.

Además, durante las valoraciones con ADN (ct-ADN o poly(dA-dT)₂) se observó un ensanchamiento diferencial^e de algunas de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas (ver figura 5.7 y figura 5.8). La existencia de este ensanchamiento diferencial de las resonancias se debe a que la relajación por acoplamiento dipolar de los protones del ligando próximos a la superficie de la macromolécula es más eficiente que los protones del ligando más alejados.^[22] De esta forma los protones del ligando próximos al ADN sufrirán un aumento de las velocidades de relajación, (R_1 y R_2). Esto se traduce en un ensanchamiento de la señal mayor que para los protones del ligando alejados.

5.2.3. Experimento DF-STD de competición entre β -D-Man (1) y β -D-Man-Py-NHAc (5) con poly(dA-dT)₂.

El objetivo de este apartado es conocer si el fragmento carbohidrato en el modelo de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5) es capaz de unirse al ADN individualmente o, por el contrario, es necesario el fragmento -Py- γ -Py-Ind para que dicha unión tenga lugar.

En esta tesis hemos puesto a punto un experimento DF-STD de competición con el fin de usarlo como método de “screening” para diferenciar compuestos que son ligandos del ADN de otros que no lo son.

El experimento STD ha sido utilizado extensamente para el estudio de complejos ligando-proteína permitiendo determinar si hay asociación y, en casos favorables, cuáles son las zonas del ligando que se encuentran en contacto directo con el centro de reconocimiento de la proteína.^[23] Sin embargo, en los estudios de interacción de los ligandos con ácidos nucleicos, son escasos los estudios estructurales que se han llevado a cabo utilizando esta técnica.^[24]

^e Se habla de un ensanchamiento diferencial, cuando a medida que se añaden cantidades crecientes de una macromolécula a la disolución de un ligando, se observa que algunas de las resonancias del ligando se ensanchan antes que otras.

En relación a los complejos ligando-ADN, Lane et al. han llevado a cabo estudios teóricos sobre el fenómeno de la transferencia de saturación en estos casos.^[25] Dedujeron que la saturación selectiva de una única resonancia de ADN no conduce a la transferencia de magnetización a la macromolécula completa, ya que la difusión de spin es menos efectiva debido a la geometría y características dinámicas, anisotrópicas, del ADN. En principio, haciendo uso de esta característica, sería posible determinar, en un complejo ligando-ADN, qué zona del ligando está próxima a una región determinada del ADN, si se satura selectivamente dicha región.

Recientemente, Gomez-Paloma et al. han descrito el empleo del experimento DF-STD (*“Differential-Frequency Saturation Transfer Difference”*) como una herramienta para distinguir entre los tres principales modos de unión ligando-ADN: unión al surco menor, interacción electrostática externa, e intercalación.^[26] Para este proceso particular de reconocimiento molecular, la diferencia entre las dimensiones horizontales y verticales de la macromolécula genera una anisotropía que provoca una difusión de la saturación con una eficacia distinta a lo largo de los dos ejes. De este modo, el resultado del experimento STD con ADN es diferente al de los complejos con proteínas. Es decir, el efecto anisotrópico en la difusión de la saturación genera distintos resultados experimentales en función de la frecuencia de saturación elegida; en definitiva, de la región espectral del ADN escogida para su irradiación selectiva.

La inspección de un modelo de *B*-ADN, (figura 5.10), indica que la localización de los átomos de hidrógeno de las desoxirribosas en relación con la estructura del surco es tal que el hidrógeno anomérico, H1', está cerca de la región interna del surco, mientras que los hidrógenos H4', H5' y H5'' apuntan hacia la zona externa del mismo. Así pues, pueden seleccionarse distintas zonas del espectro de ¹H-RMN, en las que aparecen las resonancias de estos protones del *B*-ADN. (Ver figura 5.10).

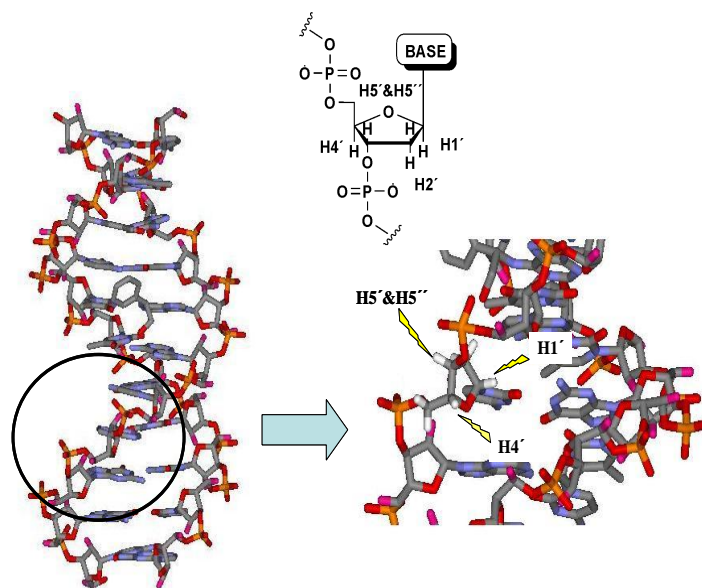


Figura 5.10. Estructura cristalina del B-ADN, donde se muestra la disposición relativa de los protones H1', H4', H5' y H5'' del anillo de desoxirribosa en la doble hélice.

En nuestro grupo de investigación, haciendo uso del experimento DF-STD, (*Differential-Frequency Saturation Transfer Difference*), se ha podido determinar la cercanía espacial de las distintas regiones de las glico-oligoamidas a la región interior o exterior del surco menor del ADN.^[24] El experimento DF-STD, que pusimos a punto, consiste en realizar dos juegos de espectros ^1H -STD, en idénticas condiciones experimentales, a dos frecuencias de saturación diferentes. Así, se seleccionaron las irradiaciones a las frecuencias correspondientes a las regiones específicas del ADN deseadas: 5.6 ppm, para H1', (región interna del surco menor) y a 4.5 ppm, para H4', H5' y H5'' (región externa del surco menor). El experimento DF-STD fue posible gracias a que los desplazamientos químicos de las resonancias de la netropsina, (ligando del surco menor del ADN que se empleó para validar el método),^[24] y de los de las glico-oligoamidas, están lo suficientemente alejados de las frecuencias de irradiación. Así, fue posible la irradiación selectiva tanto de la región externa como interna del ADN sin que exista una saturación parcial significativa de las resonancias de las glico-oligoamidas. (Ver figura 5.11).

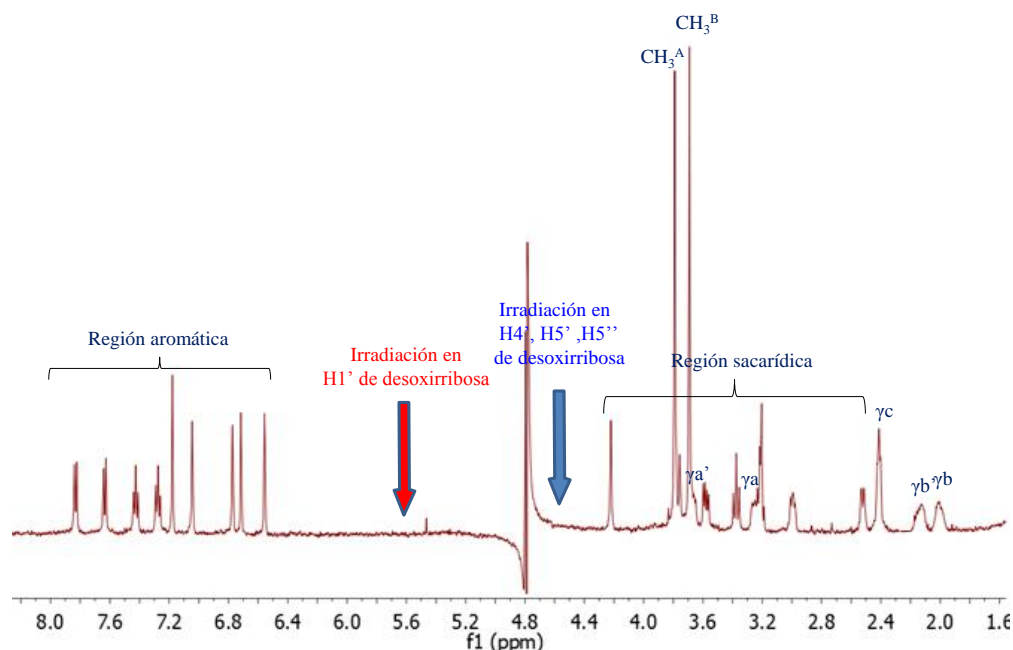


Figura 5.11. Espectro de ^1H -RMN de $\beta\text{-D-Man}$ (**1**) donde se observa las frecuencias de irradiación seleccionadas a los desplazamientos químicos de las desoxirribosas de ADN para la realización de los experimentos STD. En rojo: irradiación de $\text{H1}'$ a 5.6 ppm en el interior del surco menor del ADN. En azul: irradiación de $\text{H4}'$, $\text{H5}'$, y $\text{H5}''$ a 4.5 ppm en el exterior del surco menor del ADN.

Es decir, dado que la difusión de espín en estos sistemas es escasa, es posible verificar qué región del ligando está próxima a cada área seleccionada del surco menor del ADN.

Por otro lado, el experimento STD, como tal, se basa en la adquisición de dos espectros (normalmente de ^1H) monodimensionales de forma alterna. En uno de ellos, (experimento on-resonance), se saturan selectivamente las resonancias de la macromolécula, (mediante la irradiación con radiofrecuencias a baja potencia en una zona del espectro en la que sólo debe haber señales de la macromolécula). En el otro, (experimento off-resonance), la irradiación se fija en una zona de frecuencias que esté libre de señales de cualquiera de las especies presentes en la muestra, (normalmente valores de desplazamiento químico por encima de 20 ppm). De este modo, la diferencia entre ambos espectros mostrará exclusivamente las resonancias del ligando enlazado a la macromolécula afectadas por la magnetización, principalmente, las de sus protones próximos al centro de reconocimiento de la macromolécula. En la figura 5.12 se muestra el esquema que describe el experimento STD (Ver figura 5.12).

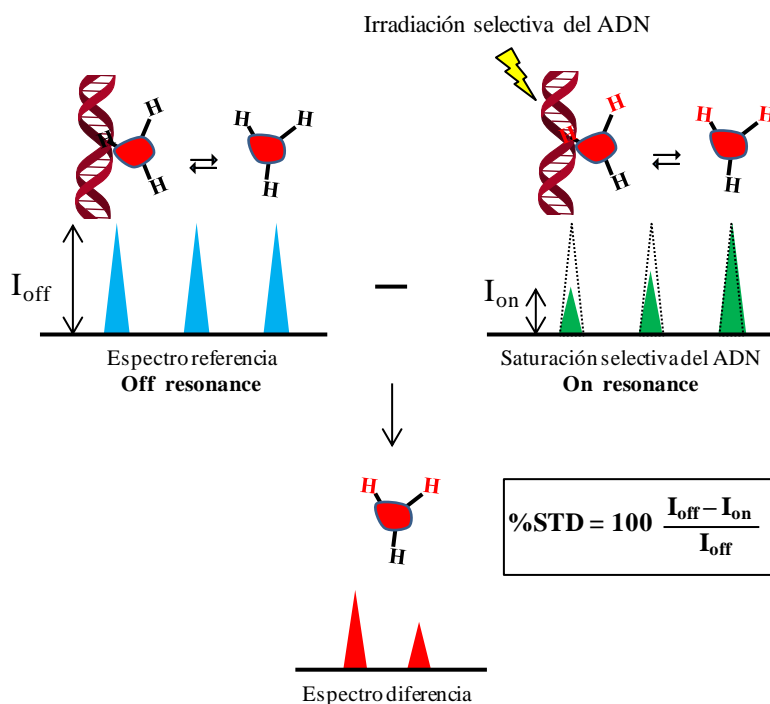


Figura 5.12. Representación esquemática del experimento STD con ADN. La diferencia entre el experimento off-resonance y on-resonance da lugar al espectro diferencia (STD) en el cual sólo aparecen, principalmente, las resonancias del ligando afectadas por la magnetización de los compuestos que interaccionan con la macromolécula. Los valores de intensidad están relacionados con la proximidad de los protones del ligando al sitio de reconocimiento de la macromolécula.

Las señales de todas las moléculas que no interaccionen con la macromolécula serán canceladas en el espectro diferencia (STD), ya que sus intensidades serán exactamente iguales en ambos experimentos (on y off). En estos experimentos, resulta ventajoso aplicar un filtro tipo "bloqueo de espines" (spin-lock, $T_{1\rho}$) para eliminar las señales anchas de la macromolécula que pudieran interferir en la integración de las señales del ligando.^[27]

Así, la sensibilidad de la técnica, puede ser utilizada para diferenciar compuestos que son ligandos de una macromolécula de otros que no lo son.^[23]

En nuestro grupo se han llevado a cabo estudios previos de interacción para diferenciar ligandos del ADN de otros que no lo son mediante valoraciones de ^1H -RMN. Así, con el fin de comprobar si el carbohidrato se unía por sí sólo al ADN, se llevaron a cabo valoraciones de ^1H -RMN entre carbohidratos sencillos, fragmentos de hebra azúcar y glico-

oligoamidas con ct-ADN por separado.^[16] Dichos experimentos han puesto de manifiesto que el fragmento de carbohidrato no muestra una unión eficiente por ct-ADN por sí solo.

En esta tesis, se ha puesto a punto un experimento DF-STD de competición para estudiar la afinidad de una mezcla de compuestos como posibles ligandos del ADN. En concreto se ha usado el polímero poly(dA-dT)₂.

El experimento realizado consistió en una competición entre los compuestos **β-D-Man (1)** y **β-D-Man-Py-NHAc (5)** con poly(dA-dT)₂. Así, queremos comprobar si el carbohidrato de manosa en el modelo de hebra azúcar **5** es capaz de unirse al ADN o, por el contrario, es necesario el fragmento **-Py-γ-Py-Ind** para la unión. Hemos escogido el derivado de manosa **β-D-Man (1)** porque su OH-2 es dador de EH cooperativo y podría facilitar la interacción también del compuesto **β-D-Man-Py-NHAc (5)**.

Para llevar a cabo el experimento DF-STD de competición con poly(dA-dT)₂ se ha seleccionado un única frecuencia de irradiación. La irradiación selectiva seleccionada ha sido en la región interna del surco menor del ADN (a 5.6 ppm) correspondiente al protón H1' de la desoxirribosa, con un tiempo de saturación de 400 ms.

Antes de llevar a cabo el experimento DF-STD de competición se realizaron experimentos STD control adicionales en ausencia de ADN de cada uno de los compuestos por separado para confirmar que la frecuencia de irradiación seleccionada no producía efecto de transferencia de magnetización significativo sobre los protones cercanos a dicha frecuencia de irradiación. Estos experimentos confirmaron que los compuestos estudiados recibían una saturación menor del 5% al irradiar en la zona del protón H1' (a 5.6 ppm) en ausencia de ADN.

Para la realización del experimento STD de competición, (figura 5.13, espectro (f)), el protocolo experimental de preparación de la muestra de RMN, consistió en la adición de una disolución de poly(dA-dT)₂ (c≈7 mM) a una disolución mezcla de la glico-oligoamida **β-D-Man (1)** y su modelo de hebra azúcar **β-D-Man-Py-NHAc (5)**. Ambos compuestos se emplearon a la misma concentración, (c≈ 200 μM), alcanzando una relación molar glico-oligoamida/modelo de hebra azúcar/ADN: 4/4/1, en D₂O (en tampón fosfato 6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄).

Tras la preparación de la muestra y para la obtención de los experimentos STD, se procedió a la irradiación selectiva de poly(dA-dT)₂ seleccionando frecuencia de irradiación a 5.6 ppm.

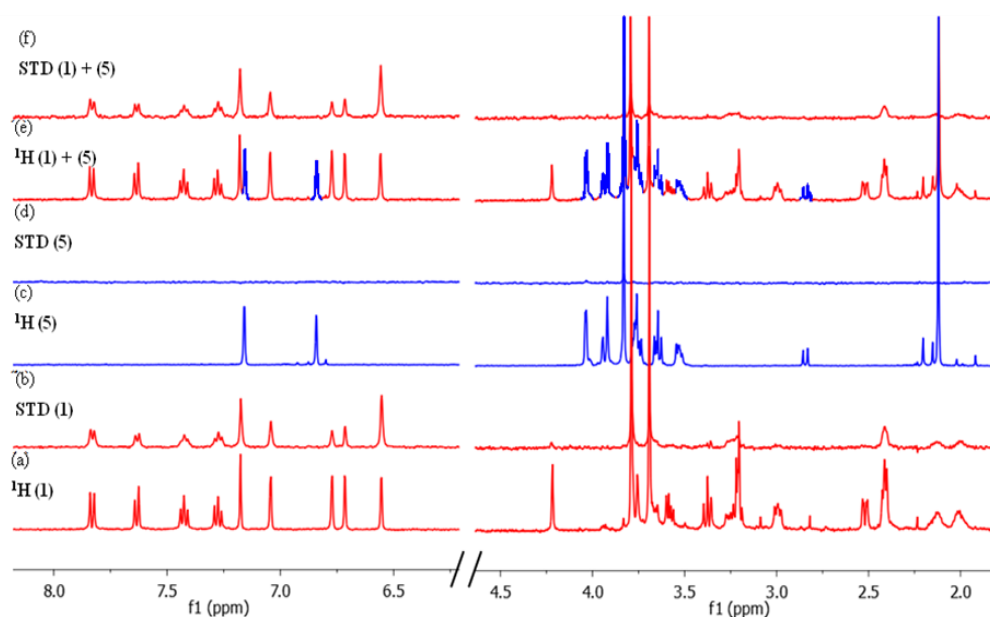


Figura 5.13. Experimentos de ¹H-RMN y STD realizados para el experimento STD de competición entre **1** y **5** con ADN; a) Espectro ¹H-RMN del compuesto **β-D-Man (1)**, (c = 340 μM); b) Espectro STD de **β-D-Man (1)**, (c = 340 μM), en presencia de poly(dA-dT)₂, (relación molar compuesto/ADN = 4/1); c) Espectro ¹H-RMN del compuesto **β-D-Man-Py-NHAc (5)**, (c = 680 μM); d) Espectro ¹H-STD de **β-D-Man-Py-NHAc (5)**, (c = 680 μM), en presencia de poly(dA-dT)₂, (relación molar compuesto/ADN = 4/1); e) Espectro ¹H-RMN de la mezcla **β-D-Man (1) + β-D-Man-Py-NHAc (5)**, (c = 200 μM); f) Espectro ¹H-STD de la mezcla **β-D-Man (1) + β-D-Man-Py-NHAc (5)**, (c = 200 μM), en presencia de poly(dA-dT)₂, (relación molar compuesto/ADN = 4/1).

El espectro STD (f) realizado con la mezcla de compuestos **1** y **5**, donde sólo se observan señales de la glico-oligoamida **1**, confirma que exclusivamente **1** recibe saturación desde el polímero de ADN, lo que es indicativo de su unión a poly(dA-dT)₂.

Para validar el experimento STD de la mezcla de **1** y **5** con el ADN, se llevaron a cabo experimentos STD de los compuestos por separado con el poly(dA-dT)₂ en una relación molar glico-oligoamida/ADN 4/1. (Ver figura 5.13, espectros b y d).

Así, se observó transferencia de saturación al irradiar a 5.6 ppm el poly(dA-dT)₂ en el complejo con **β-D-Man (1)**. (Ver espectro (b), figura 5.13). Sin embargo, el espectro (d) revela

que la transferencia de saturación no fue efectiva al irradiar poly(dA-dT)_2 en presencia de **β -D-ManPy-NHAc (5)**.

Como conclusión, con este experimento se confirma la eficacia del STD para diferenciar entre una mezcla de compuestos los que son ligandos de una macromolécula de otros que no lo son.

5.3. Estudios estructurales de los complejos de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8), 6-desoxy- β -D-Man (9) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT)_2 por RMN.

En casos favorables, mediante RMN, puede detectarse la existencia de reconocimiento molecular entre dos moléculas,^[10a,11] conocer entre qué regiones del ligando y del receptor tiene lugar la interacción e incluso cuáles son las conformaciones bioactivas de ambas entidades. Además, los experimentos de RMN tienen la ventaja de poder detectar interacciones intermoleculares débiles ($K_D \sim \text{mM}$).

En general, existen dos aproximaciones para evaluar la formación de complejos por RMN. La primera se centra en seguir las variaciones de parámetros de RMN del ligando, especialmente los cambios que se producen en sus propiedades de relajación y de difusión al pasar del estado libre al asociado. La segunda explora las variaciones de desplazamiento químico de los núcleos de la macromolécula al asociarse a la molécula pequeña. Las dos aproximaciones son complementarias, tienen rangos de aplicación diferentes y ventajas e inconvenientes.

Así, desde la perspectiva de observación de las resonancias del ligando, algunos de los métodos más comunes utilizados en los últimos años en RMN son el NOESY transferido (TR-NOESY)^[9] y el experimento de transferencia de saturación (STD),^[28] los cuales nos permiten obtener información estructural de complejos ligando-macromolécula.^[12,27]

En particular, los experimentos TR-NOESY se basan en la detección de las señales del ligando libre en intercambio con un receptor, para obtener información sobre la conformación del ligando en el estado asociado.^[9] Por otro lado, es posible llevar a cabo la descripción del epítipo del ligando directamente implicado en la asociación al receptor usando experimentos STD.^[23,29] Estos dos experimentos (TR-NOESY y STD), que se basan en la transferencia de magnetización inter-molecular entre el ligando y el receptor, se han utilizado ampliamente para el estudio de complejos ligando-proteína^[30] y en menor medida ligando-ácido nucleico.^[26]

Uno de los requisitos necesarios para llevar a cabo los experimentos TR-NOESY y STD es que se establezca un intercambio rápido entre la especie libre y asociada en la escala de tiempos de la relajación. Las proteínas transmiten la saturación de una manera altamente eficaz, una característica de macromoléculas globulares. Pero en cambio, la menor cantidad de protones en los ácidos nucleicos, así como su particular geometría, hace que los experimentos correspondientes tengan unas peculiaridades diferenciales.

Los métodos basados en la observación de las señales de los ligandos se apoyan en el hecho de que es posible distinguir entre los estados libre y asociado desde el punto de vista de la RMN, gracias a las diferencias de la velocidad rotacional y traslacional de una molécula pequeña al pasar del estado libre al asociado. La ventaja de este método radica en evitar la necesidad de producir grandes cantidades del receptor marcado isotópicamente. Además, tampoco es necesaria la asignación de la proteína, ni imprescindible el conocimiento de su estructura tridimensional. La ausencia de estos requisitos hace que estos métodos sean más rápidos y de mayor aplicabilidad al estudio de los procesos de formación de los complejos que los basados en la observación del receptor.^[27]

Las aproximaciones basadas en la observación del ligando consisten en la transferencia, mediada por intercambio químico, de la información del estado asociado al estado libre. Este requisito hace que estos métodos sean útiles para la identificación de ligandos con afinidades entre débiles y moderadas (intercambio relativamente rápido, con K_{off} mayor de $2\text{-}3\text{ s}^{-1}$).^[27]

En esta tesis se han llevado a cabo los estudios estructurales de interacción con dos tipos de polímeros de ADN, ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

Se eligió el “calf thymus” ADN (ct-ADN) como un sistema idóneo ya que contiene un número elevado de pares de bases cuya combinación en la doble hélice da lugar, a su vez, a un gran número de secuencias diferentes, posibles diana de los ligandos objeto de estudio.

Además de realizar los estudios de interacción con ct-ADN se ha empleado el polímero de ADN poly(dA-dT)₂ para llevar a cabo el mismo tipo de estudios estructurales debido a la selectividad de las glico-oligoamidas por secuencias -AT-.

De los experimentos TR-NOESY podemos obtener información relativa a la conformación de los ligandos en el estado asociado. Nuestro objetivo es, por un lado, conocer si las glico-oligoamidas siguen manteniendo la conformación en horquilla en el estado

enlazado al ADN mediante la detección de nOes entre las dos unidades de pirrol y entre el carbohidrato y el indol. En casos favorables, podremos conocer cuál es la cara del carbohidrato seleccionada por el indol.

Por otro lado, los experimentos STD, como se comentó en el apartado 5.2.3 de este capítulo, nos dan información acerca de cuál es la zona más reconocida del ligando por la macromolécula. Así, podremos determinar los centros de la glico-oligoamida, tanto del fragmento **-Py- γ -Py-Ind** como del azúcar, que más se aproximan hacia el interior del surco menor del ADN. Más en concreto, trataremos de determinar la orientación de los posibles centros dadores de EH cooperativos en el surco menor del ADN.

Además, toda la información aportada por los experimentos TR-NOESY simultáneamente con la extraída de los experimentos STD nos permitiría conocer el sentido del plegamiento de cada una de las glico-oligoamidas (N-C ó C-N) en el sentido 5'-3' de la doble hebra.

5.3.1. Experimentos de nOe transferido (TR-NOESY) de los complejos de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

El objetivo de este apartado es obtener información acerca de la conformación de las glico-oligoamidas en el estado enlazado a ct-ADN y poly(dA-dT)₂. Queremos determinar si las glico-oligoamidas siguen manteniendo la estructura en horquilla en el estado enlazado a ADN y conocer la disposición del carbohidrato respecto del indol.

Está bien establecido que los efectos nOe son muy útiles para la determinación de la estructura de moléculas en disolución.^[31] Generalmente, los ligandos son moléculas de bajo peso molecular que se caracterizan por tener tiempos de correlación cortos lo que se traduce en velocidades de relajación lentas y coeficientes de difusión translacional relativamente altos. Teniendo en cuenta la relación que existe entre el efecto nuclear Overhauser y el tiempo de correlación (Figura 5.14) los picos de cruce de los experimentos NOESY de moléculas pequeñas presentan signos opuestos a los de la diagonal (nOes positivos). Por el contrario, las moléculas de alto peso molecular como las proteínas, tienen tiempos de correlación largos, que se corresponden con velocidades de relajación rápidas y velocidades de difusión lentas. En este caso, los picos de cruce de los espectros NOESY de las macromoléculas aparecen con el mismo signo que los de la diagonal (nOes negativos).

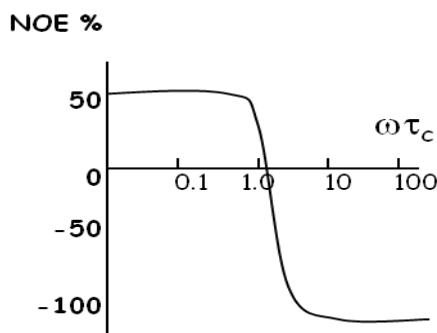


Figura 5.14. Dependencia del incremento de nOe homonuclear con $\omega\tau_c$. Donde es la frecuencia del espectrómetro y τ_c el tiempo de correlación de la molécula.

Cuando una molécula pequeña (ligando) se asocia a una macromolécula, sus propiedades de RMN cambian y adquieren las propiedades de ésta. Por lo tanto, en el estado asociado, los ligandos presentan velocidades de relajación rápidas, picos de cruce NOESY de signo igual que los de la diagonal y coeficientes de difusión más pequeños. Estas diferencias de comportamiento permiten realizar diversos experimentos de RMN capaces de diferenciar los estados libre y asociado del ligando y por tanto determinar si existe interacción entre el ligando y la macromolécula. El cambio de signo en el nOe de un ligando cuando es reconocido por una proteína, debido al cambio en el tiempo de correlación, se conoce como nOe transferido (TR-NOESY).^[32] Estos TR-NOES reflejan la conformación del ligando en el estado asociado.

Si se consideran un par de núcleos, I y S, de un ligando L que se encuentra en intercambio rápido en la escala de desplazamientos químicos entre la forma libre (l) y la unida (u) a una macromolécula M, el nOe observado en una señal determinada es un promedio resultante de la contribución de los nOes de ambos estados, que se expresa en función de la constante de velocidad de relajación promedio ($\langle\sigma_{IS}\rangle$) y que viene descrita por la siguiente expresión:

$$\langle\sigma_{IS}\rangle = X^l \sigma_{IS}^l + X^u \sigma_{IS}^u$$

Siendo σ_{IS}^l y σ_{IS}^u las constantes de relajación cruzada de la forma libre y unida para el sistema IS, y X^l y X^u las fracciones molares correspondientes. Así, si en esta expresión domina el término de la forma unida, los nOes observados caracterizarán a la conformación del ligando en el estado asociado, mientras que si el término que domina la expresión es el correspondiente

al estado libre, los nOes reflejarán la conformación del ligando en dicho estado. Las condiciones que deben darse en un experimento TR-NOESY están resumidas en la Figura 5.15.

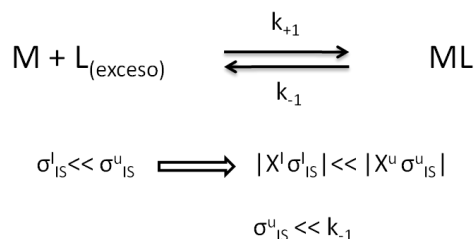


Figura 5.15. Esquema de las condiciones que deben darse en el experimento TR-NOESY. Donde M=macromolécula; L= ligando; ML= complejo ligando–macromolécula; $\sigma_{\text{IS}}^{\text{l}}$ = velocidad de relajación dipolar del ligando asociado; $\sigma_{\text{IS}}^{\text{l}}$ = velocidad de relajación dipolar del ligando libre; X^{u} = fracción molar del ligando asociado; X^{l} = fracción molar del ligando libre; k_{+1} = constante de velocidad de pseudoprimer orden de asociación del complejo ligando-macromolécula; k_{-1} = constante de velocidad de disociación del complejo ligando-macromolécula.

La constante de velocidad de relajación cruzada (σ) está relacionada con el tiempo de correlación (τ_c). Las moléculas de peso molecular bajo tienen un τ_c corto y, como consecuencia, exhiben nOes positivos. Cuando una molécula pequeña se une a una proteína, su tiempo de correlación efectivo varía, y gira con movimientos lentos, como si fuera parte de la proteína, lo que da lugar a los nOes transferidos negativos.

Las condiciones para que el TR-NOE se produzca serán más favorables cuanto más grande sea la macromolécula, ya que el tamaño del complejo será mayor y, por tanto, el tiempo de correlación correspondiente al estado asociado del ligando también lo será.

Respecto a la afinidad del ligando, como se ha mencionado anteriormente, es necesario que exista un intercambio rápido entre la forma libre y la forma unida, de tal modo que se produzca transferencia de información entre los dos estados. Para que esto ocurra, la velocidad de disociación del complejo debe ser rápida en la escala de tiempos de relajación, lo que suele ocurrir en el rango de afinidades que va desde 100 nM a 10 mM. La velocidad de relajación dipolar del ligando asociado (σ^{u}), relacionada directamente con el nOe, es siempre mayor que la velocidad de relajación dipolar del ligando libre (σ^{l}) y tiene que ser menor que k_{-1} . Si la constante de velocidad de disociación es más lenta que la velocidad de relajación, se pierde la información del nOe, ya que, el efecto desaparece antes de que el complejo se disocie.

Sin embargo, si la constante de disociación es rápida, las señales del ligando aún contienen “la memoria” del estado asociado, y permiten deducir su conformación en el sitio de reconocimiento. En estas condiciones, es posible registrar un espectro NOESY del ligando en presencia del receptor, donde la información de los nOe que se obtienen corresponden a la conformación del ligando asociado.

Experimentalmente el TR-NOESY se realiza mediante una secuencia NOESY aplicada a un ligando en intercambio entre su estado libre y asociado. (Ver figura 5.16). El ligando está en exceso respecto al receptor, por lo que los desplazamientos químicos observados están muy próximos a los del ligando libre.

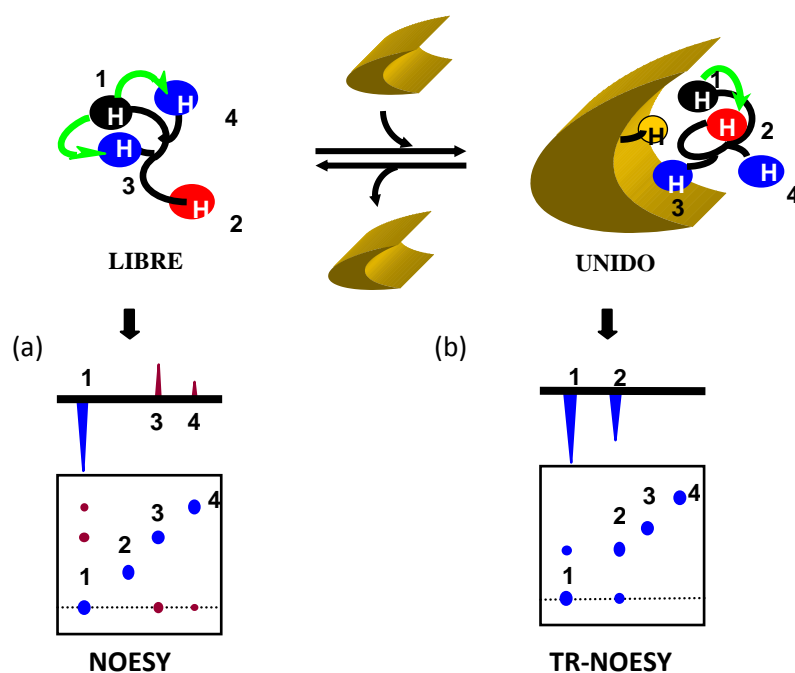


Figura 5.16. Representación esquemática del experimento TR-NOESY. (a) En el NOESY del ligando libre los nOes son positivos; (b) En el TR-NOESY, los nOes son negativos e intensos y contienen información de la conformación del ligando asociado a la macromolécula.

Si existe asociación, en el experimento TR-NOESY se observarán nOes negativos e intensos, característicos de un ligando asociado a la macromolécula, a diferencia de los nOes

que se obtienen para un ligando pequeño en el estado libre son positivos y pequeños.^f (Figura 5.16).

Los experimentos TR-NOESY y DF-STD de las glico-oligoamidas en presencia de ADN se realizaron en un punto tal que, aunque las señales de ¹H-RMN habían sufrido un ensanchamiento evidente, seguían siendo claramente observables. En todos los casos, la muestra para los experimentos de nOe transferido (TR-NOESY) y de diferencia de transferencia de saturación (STD) fue preparada de la misma manera (véase apartado 8.4 en la parte experimental).

El protocolo experimental, para la preparación de la muestra de RMN, consistió en la adición de cantidades crecientes de una disolución de ADN a una disolución de glico-oligoamida (en el rango de 300-600 μM) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄). La relación molar ligando/ADN en los complejos fue, generalmente, tanto con el polímero de ct-ADN como con poly(dA-dT)₂, de 4/1.^g La presencia del complejo glico-oligoamida:ADN en disolución se detectó por el progresivo ensanchamiento de las resonancias correspondientes a la glico-oligoamida. En estas condiciones existe un intercambio rápido entre el ligando asociado y el ligando libre, donde el ligando libre se encuentra en exceso en la muestra de RMN.

El experimento se puso a punto con ct-ADN. Así, se registraron los espectros TR-NOESY de las glico-oligoamidas **β-D-Man (1)** y **β-L-Man (7)** en los complejos con ct-ADN a 25° C en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄), usando distintos tiempos de mezcla (τ_m = 200 y 400 ms para el complejo de **1** con ct-ADN y τ_m = 50, 100, 200 y 400 ms para el complejo de **7** con ct-ADN).^h Los mejores resultados, en términos de mayor relación señal/ruido y menor difusión de spin, se obtuvieron cuando se utilizó como tiempo de mezcla τ_m = 200 ms.

^f Las moléculas pequeñas, con un régimen de movimiento rápido, presentan nOes positivos con un valor máximo del 50%, mientras que las moléculas de gran tamaño, con un régimen de movimiento lento, presentan nOes negativos y pueden alcanzar un valor máximo del 100%.

^g En el caso del complejo de **6-desoxy-β-D-Man (9)** con ct-ADN la relación molar ligando/ADN fue 3/1.

^h El tiempo de mezcla, τ_m , es el tiempo que se emplea para transferir la magnetización mediante la relajación dipolar. Hay que tener en cuenta que el uso de tiempos de mezcla largos implica una mayor probabilidad de detección de nOes entre protones relativamente alejados favoreciendo la difusión de spin. La difusión de spin se produce por transferencia de magnetización entre dos spines alejados, pero que están próximos a otro o varios spines comunes, que actúan como intermediarios de la transferencia

En las figuras 5.17 y 5.18, se muestra a modo de ejemplo, los espectros TR-NOESY en D₂O obtenidos para la **β -D-Man (1)** con los polímeros de ct-ADN y poly(dA-dT)₂ respectivamente en una relación molar ligando/ADN 4/1 para ambos complejos. En ambos casos se incluye una ampliación de la región espectral donde se detectan los nOes que confirman la existencia de la conformación en horquilla del ligando en el estado enlazado tanto a ct-ADN como a poly(dA-dT)₂. (Ver figuras 5.17 y 5.18).

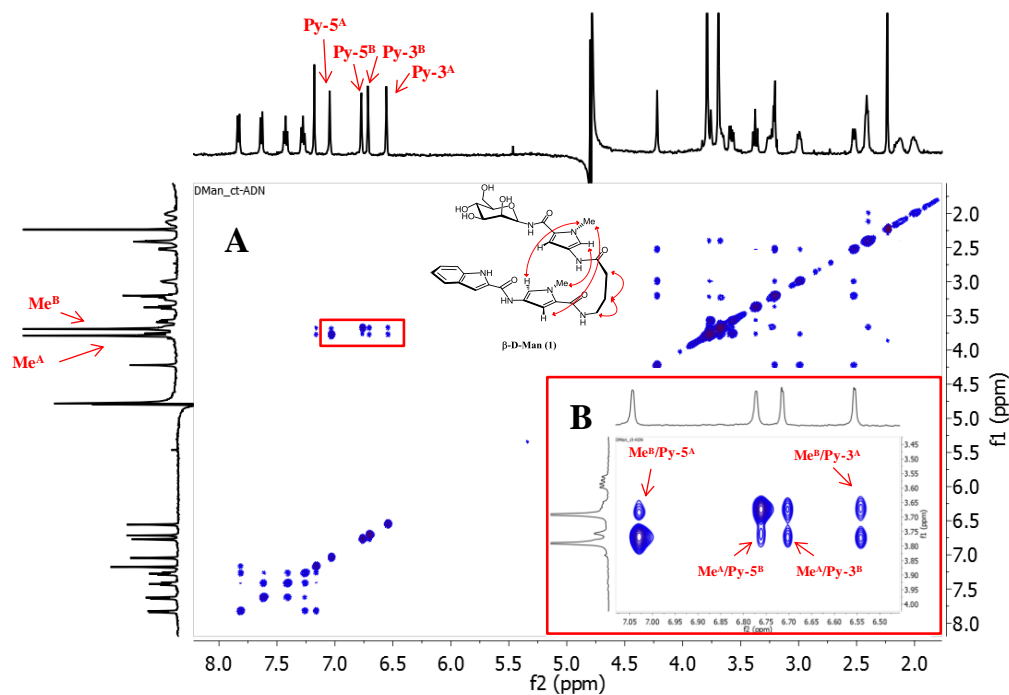


Figura 5.17. A) TR-NOESY (500MHz, τ_m =200 ms, 25°C) de **β -D-Man (1)** (c = 880 μ M) vs ct-ADN (c =220 μ M) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

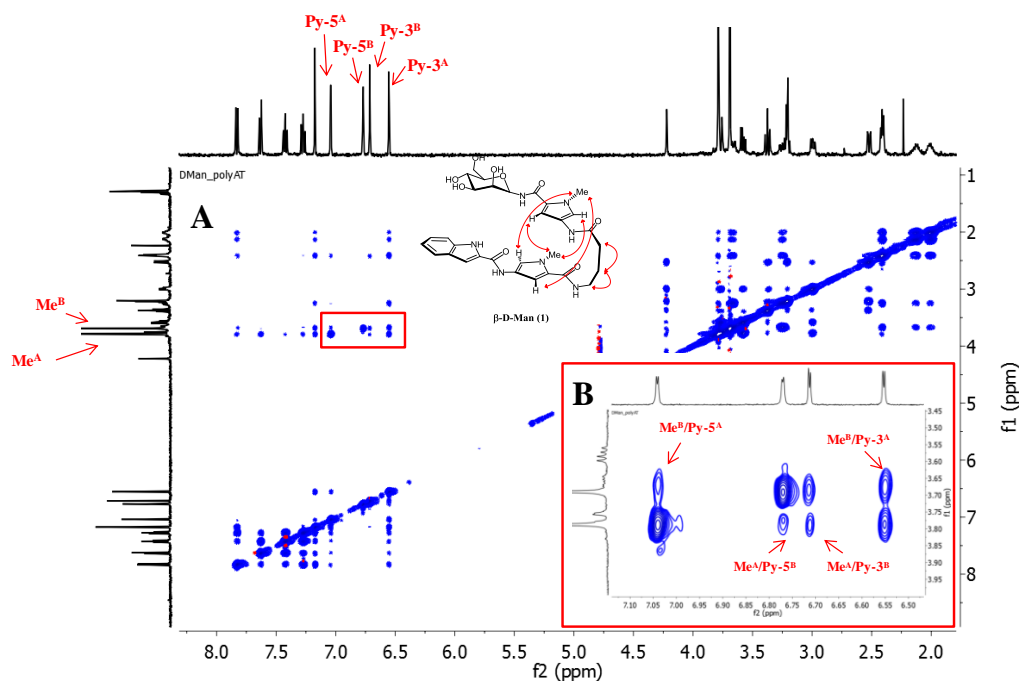


Figura 5.18. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de β -D-Man (**1**) ($c=220 \mu\text{M}$) vs poly(dA-dT)₂ ($c=55 \mu\text{M}$) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

Si bien las glico-oligoamidas en el estado libre muestran picos de cruce nOe pequeños y negativos, en los complejos **1**, **2**, **7-9** con ct-ADN y poly(dA-dT)₂ los nOes son intensos y negativos. Los espectros con los nOes inter-hebra característicos de cada una de las glico-oligoamidas que confirman la presencia de la conformación plegada el estado enlazado a ct-ADN y a poly(dA-dT)₂ se muestran en las figuras 9.12–9.18 del anexo.

En la figuras 5.19 se representa, el resumen de los nOes intra e inter-hebra observados, característicos de cada una de las nuevas glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** con ct-ADN (figura 5.19 arriba) y con poly(dA-dT)₂ (figura 5.19 abajo).

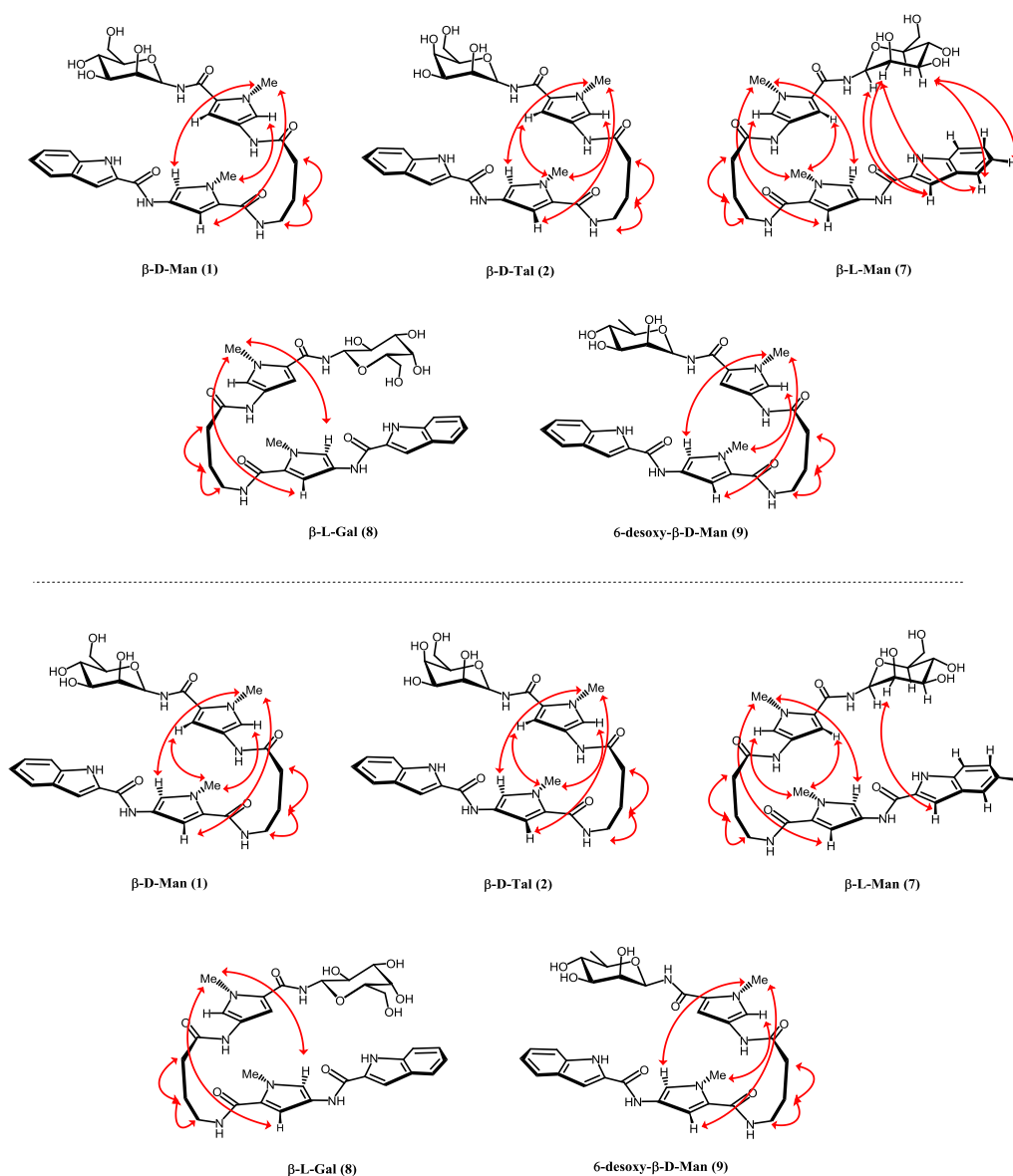


Figura 5.19. Arriba: nOes intra e inter-hebra más característicos detectados en el experimento TR-NOESY de los complejos de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** con ct-ADN (arriba). La relación molar Ligando/ct-ADN fue 4/1 para **1**, **2**, **7** y **8** y 3/1 para **9**. Condiciones de: **1** ($c=880\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms), **2** ($c=600\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms), **7** ($c=450\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms), **8** ($c=300\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms) y **9** ($c=350\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms). Abajo: nOes intra e inter-hebra más característicos detectados en el experimento TR-NOESY de los complejos de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** con poly(dA-dT)₂. La relación molar Ligando/poly(dA-dT)₂ fue 4/1 en todos los casos. Condiciones de: **1** ($c=220\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms), **2** ($c=600\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms), **7** ($c=450\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms), **8** ($c=300\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms) y **9** ($c=350\mu\text{M}$, $\tau_m=200$ ms). Todos los experimentos se realizaron a 500MHz en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C, referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

En todos los casos se observaron nOes inter-hebra $\text{Py-5}^{\text{A}}\text{-Me}^{\text{B}}$ y $\text{Py-5}^{\text{B}}/\text{Me}^{\text{A}}$ que confirman la presencia de la conformación plegada de las glico-oligoamidas tanto en el estado enlazado a ct-ADN como a poly(dA-dT)_2 . Dichos nOes son característicos de la conformación plegada en horquilla de las glico-oligoamidas,^[16,24] miméticos de factores de transcripción estudiados anteriormente en nuestro grupo^[33] y las oligoamidas de P. Dervan,

En el caso concreto del complejo de **β -L-Man (7)** con ct-ADN se encontraron nOes carbohidrato-indol (H-1/Ind-3, H-2/Ind-3, H-2/Ind-4, H-3/Ind-4 y H-3/Ind-6) confirmando la cercanía de la cara α del carbohidrato de L-Manosa al indol en el complejo. (Ver figuras 5.20 y 5.21).

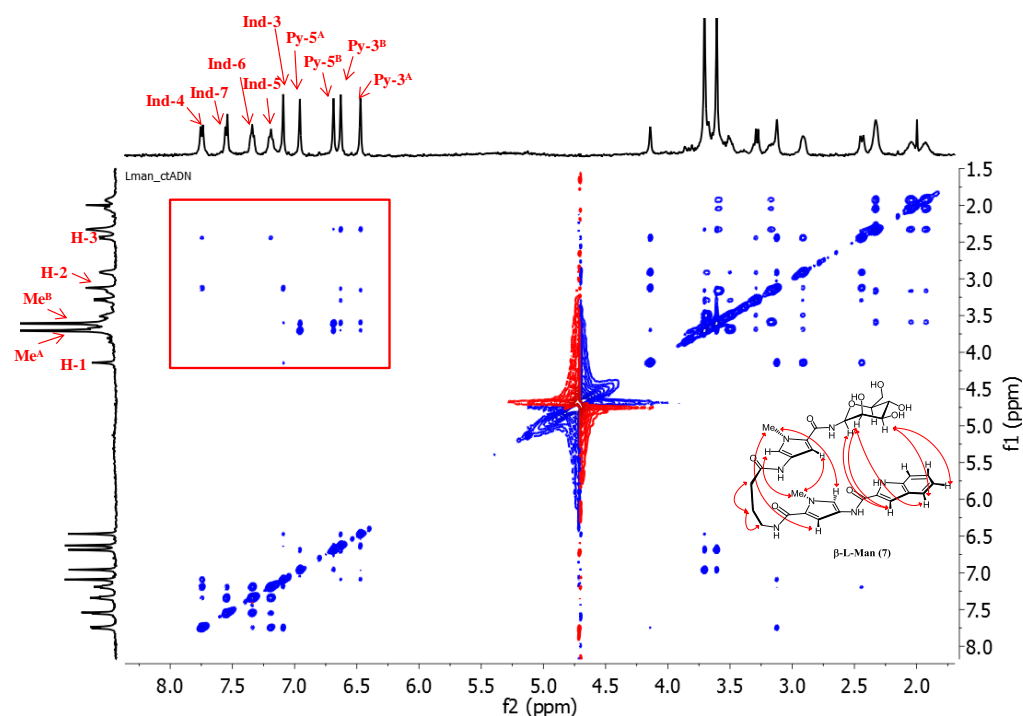


Figura 5.20. TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de **β -L-Man (7)** ($c=300$ μM) vs ct-ADN ($c=75$ μM) (Ligando:ADN=4/1) en D_2O (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

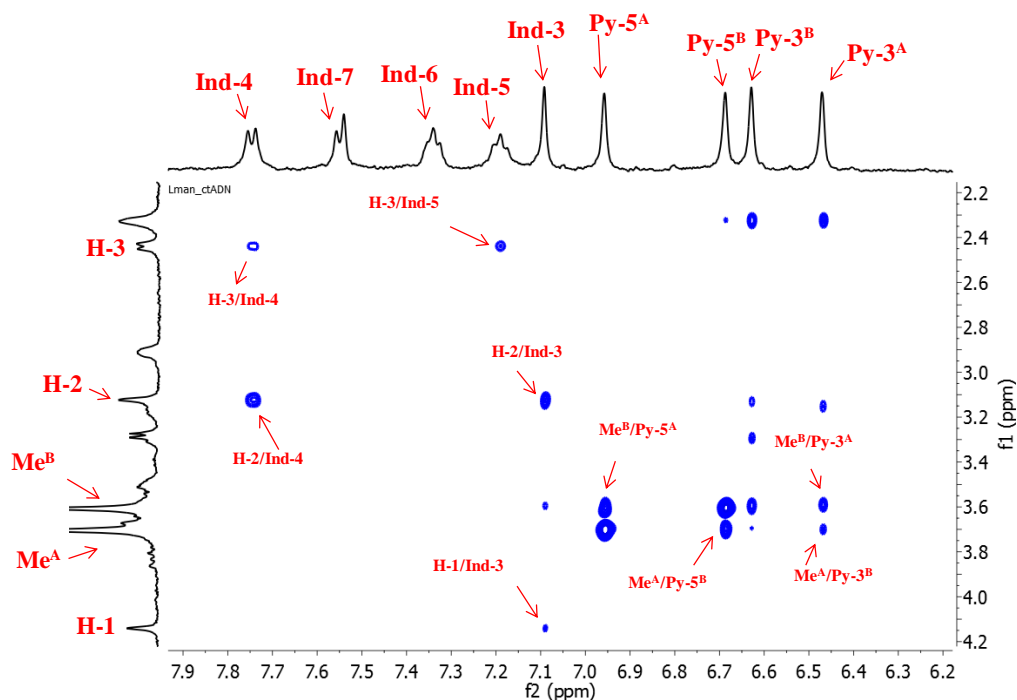


Figura 5.21. Ampliación de la región espectral del TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de **β -L-Man (7)** ($c=300 \mu\text{M}$) vs ct-ADN ($c=75 \mu\text{M}$) (Ligando:ADN=4/1) en D_2O (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

Por otro lado, en el espectro TR-NOESY, para la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** en el complejo con $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ se ha detectado un nOe carbohidrato/índol H-2/Ind-3 indicativo de la cercanía de la cara α del carbohidrato y el índol en dicho complejo. (Ver figura 5.19 arriba y figura 9.14 del anexo).

Por lo tanto, en base a los datos estructurales mencionados, podemos decir que la estructura en horquilla de la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** es la mejor definida de todas las glico-oligoamidas tanto en el estado enlazado a ct-ADN como en el complejo con $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$.

Así, se puede decir que de todas las estructuras propuestas para las glico-oligoamidas con L carbohidratos en los esquemas 1.2 y 1.3, (capítulo 1, páginas 52 y 53 respectivamente), en el caso de **β -L-Man (7)**, sólo dos de ellas están de acuerdo con los datos experimentales de TR-NOESY con ambos polímeros. (Estructura A' y D'). (Ver figura 5.20).

Estas dos estructuras tienen en común que la cara α del carbohidrato se encuentra próxima al índol pero cada una representa un sentido de plegamiento diferente. La estructura

A' posee un plegamiento en sentido C-N y la estructura D' posee un plegamiento en el sentido N-C. (Ver figura 5.20).

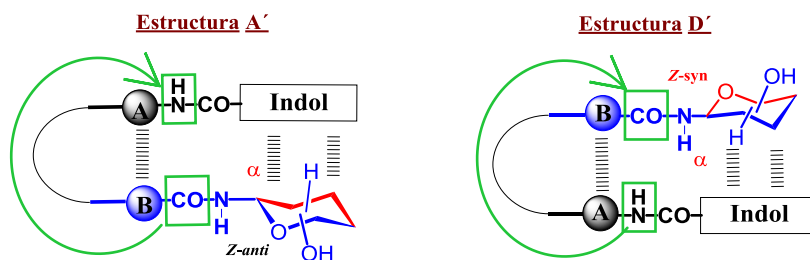


Figura 5.20. Estructuras posibles de la glico-oligoamida β -L-Man (7) en el complejo con ct-ADN. Estructura A': sentido del plegamiento C-N con la cara α del carbohidrato cercana al indol y los centros O5, C5 y C6 orientados hacia el arco N-Me. Estructura D': sentido del plegamiento N-C con la cara α del carbohidrato cercana al indol y los centros C2 y C3 hacia el arco N-Me.

Los experimentos STD serán de gran ayuda para poder definir cuál de las estructuras es la que adopta β -L-Man (7) en el estado enlazado tanto a ct-ADN como a poly(dA-dT)₂.

5.3.2. Experimentos de DF-STD de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) en los complejos con ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

El objetivo de este apartado es obtener información sobre la cercanía de los distintos residuos de las glico-oligoamidas a zonas específicas del ADN así como su orientación en el surco menor del ADN.

La adquisición de los experimentos STD nos ayudará a definir la orientación de los centros dadores de EH cooperativos en el surco menor del ADN y, junto con la información extraída de los experimentos TR-NOESY, podremos conocer el sentido de plegamiento N-C ó C-N de la glico-oligoamida en la dirección 5'-3' de la doble hebra de ADN.

Como se comentó en el apartado 5.2.3, en nuestro grupo de investigación, hemos hecho uso del experimento DF-STD,^[26] para determinar la cercanía espacial de las distintas regiones de las glico-oligoamidas a la región interior o exterior del surco menor del ADN. (Ver figuras 5.10 y 5.11 del apartado 5.2.3).

Así, en los experimentos que se describen a continuación, se seleccionaron las irradiaciones a las frecuencias correspondientes a la región interna del surco menor del ADN (5.6 ppm para H1') y región externa del surco menor del ADN (4.5 ppm para H4', H5' y H5'').

En todos los casos, los STD de los protones individuales de cada compuesto, que representan la variación en la intensidad de las resonancias, se calcularon en relación a un espectro referencia, obtenido por irradiación a 100 ppm (espectro off resonance), (véase el apartado 5.2.3, figura 5.12, de la página 21 de este capítulo). Por último se llevó a cabo un análisis comparativo de los STD observados en las resonancias de los dos juegos de experimentos realizados. Este análisis consistió en normalizar la intensidad de cada pico del espectro STD en relación a la señal de un protón (Py-3^{A} en todos los casos), a cuya intensidad se le asignó un valor de 100. Así, se compararon los valores normalizados de la resonancia de cada protón al irradiar en la zona interior (5.6 ppm) y exterior (4.5 ppm) del surco menor del ADN calculándose el cociente $I_{\text{f}}/I_{\text{d}}$. Donde I_{f} es el valor de intensidad de STD cuando la irradiación selectiva del ADN ha sido llevada a cabo en la región externa del surco menor del ADN, e I_{d} es el valor de la intensidad de STD cuando la irradiación se ha llevado a cabo en la región interna del surco menor del ADN. Así, el valor de $I_{\text{f}}/I_{\text{d}}$ nos dará información de la orientación de cada resonancia respecto del interior del surco menor del ADN.

El porcentaje de STD de los protones del ADN a los protones del ligando depende fundamentalmente del tiempo de saturación, de la constante de asociación y de las fracciones molares de ligando libre y enlazado. En general, si el tiempo de saturación es demasiado corto, la transferencia de saturación no será suficientemente eficiente y no se podrá identificar claramente el epítipo de unión de nuestro ligando a la macromolécula. Por el contrario, si es demasiado largo, la magnetización puede ser transferida a lo largo de toda la molécula enlazada por difusión de spin.

El tiempo de saturación fue optimizado previamente con otras glico-oligoamidas^[24] realizándose una batería de experimentos a distintos tiempos de saturación (50, 150, 250, 300, 400 ms). El valor de tiempo de saturación que proporcionó una mejor relación señal/ruido y menor difusión de spin fue 400 ms. Por tanto, los experimentos realizados en esta tesis se llevaron a cabo a un tiempo de saturación de 400 ms.

Se han llevado a cabo los experimentos STD de las nuevas glico-oligoamidas **β -D-Man (1)**, **β -D-Tal (2)**, **β -L-Man (7)**, **β -L-Gal (8)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** asociadas a ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

En la figura 5.21 se muestra, a modo de ejemplo, los espectros off-resonance, on-resonance y diferencia (STD) obtenidos para el complejo **β -D-Man (1)** con poly(dA-dT)₂, irradiando selectivamente en la zona del protón H1' (5.6 ppm) y H4, H5 y H5' del ADN.

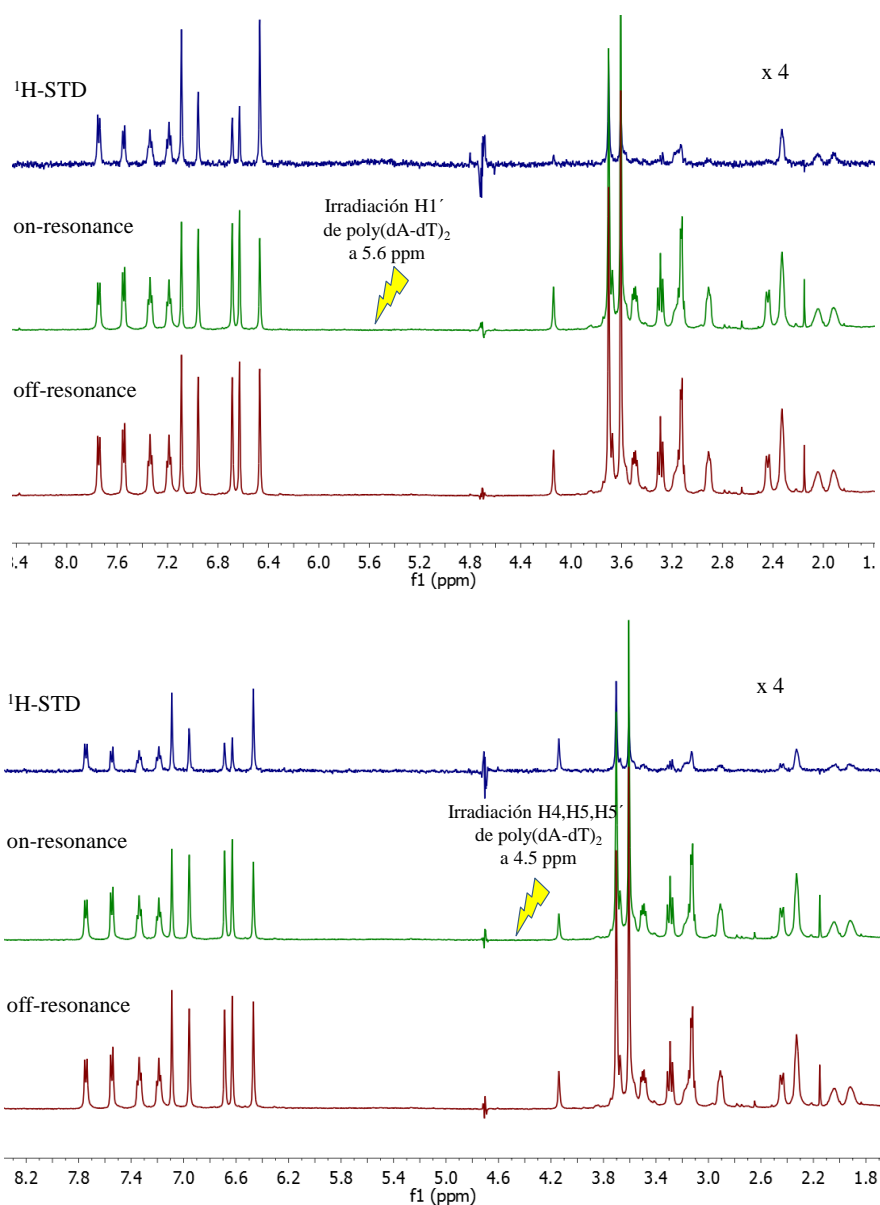


Figura 5.21. Experimento ^1H -STD (500 MHz) de $\beta\text{-D-Man}$ (**1**) ($c = 220\mu\text{M}$) en presencia de poly(dA-dT)_2 (relación molar Ligando/ADN = 4:1) en D_2O (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) a 25°C . Referencia TSP- d_4 (0.00 ppm). Arriba: la irradiación selectiva en el interior del surco menor del ADN (5.6 ppm). Abajo: la irradiación selectiva en el exterior del surco menor del ADN (4.5 ppm). Espectros off-resonance (rojo); espectros on-resonance (verde) y espectros diferencia ^1H -STD (azul). Los experimentos fueron realizados con supresión de la señal residual de HDO, utilizando la secuencia de pulsos “3-9-19 watergate” con gradientes y añadiendo a la secuencia de pulsos un filtro T1 ρ . En cada caso se indica el factor por el que se multiplica la intensidad del espectro diferencia ^1H -STD.

Por un lado, al efectuar los experimentos DF-STD de todas las glico-oligoamidas con los dos polímeros de ADN, la observación de señales claras en el espectro diferencia confirmó que cada uno de estos ligandos se unen a ambos polímeros de ADN al emplear las dos frecuencias de irradiación.

Por otro lado, en todos los complejos, existe transferencia de saturación a toda la glico-oligoamida, incluido el carbohidrato dependiendo de la frecuencia de irradiación. Además, en la figura 5.21, al comparar las intensidades de los espectros de STD con las intensidades de los espectros de referencia (off-resonance), se observa una distribución diferencial de la saturación transferida desde los protones del ADN a los diferentes protones del ligando **β -D-Man (1)** en el estado enlazado a ADN.

Se realizaron una serie de experimentos STD control de todas las glico-oligoamidas en ausencia de ADN comprobando que no recibían saturación indirecta cuando se irradia en la zona del protón H1' (5.6 ppm). Sin embargo, cuando la irradiación se realizó a 4.5 ppm se encontró un efecto de saturación indirecta mayor al 5% en el caso de las resonancias del protón anomérico, Me^A y Me^B. (Ver figuras 9.19 y 9.20 del anexo). Así, para el cálculo de las intensidades de STD (%I_{STD}) en presencia de ADN se restó el %I indirecta recibida para cada señal en el experimento control.

En las tablas 9.13 y 9.14 del anexo se muestran los valores de % STD sin normalizar obtenidos para los protones de las glico-oligoamidas tanto irradiando a 4.5 ppm como a 5.6 ppm tanto en el estado enlazado a ct-ADN como a poly(dA-dT)₂ respectivamente. En general, las intensidades de todas las resonancias de los protones pudieron ser medidas con precisión al no presentar solapamiento con otras señales.ⁱ

La primera conclusión de los experimentos DF-STD es que el ligando se une al surco del ADN de manera que queda cerca de ambas regiones de la macromolécula (H1' y H4', H5' y H5'').

En el tratamiento de los datos, se estimó que si el valor de I_f/I_d era mayor que 1.1 dicho protón estará próximo al exterior del surco menor del ADN, mientras que si el valor es menor o igual a 1.1, dicho protón se orienta hacia el interior del surco.

ⁱ No se pudo determinar con exactitud las intensidades de las resonancias de los protones sacarídicos de la glico-oligoamida **β -L-Gal (8)** por mostrar un solapamiento considerable.

En la figura 5.22 se muestra el resumen de los resultados de los experimentos DF-STD obtenidos para las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** con ct-ADN (figura 5.21 arriba) y con poly(dA-dT)₂ (figura 5.22 abajo). Las resonancias en azul vieron perturbada más su intensidad al irradiar la región espectral correspondiente a los protones H4', H5' y H5'' (irradiación en el exterior del surco menor del ADN) de desoxirribosa. Su valor de I_f/I_d se encuentra por encima de 1.1. Las resonancias en rojo se corresponden con el epítipo del ligando próximo a la región interna del surco menor, obtenido al irradiar sobre H1' del ADN. (Ver figura 5.22). Su valor de I_f/I_d es ≤ 1.1 . En las tablas 9.15 y 9.16 del anexo se muestran los valores de relación de intensidades I_f/I_d de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** en los complejos con ct-ADN y poly(dA-dT)₂ respectivamente.

Experimentos DF-STD con ct-ADN

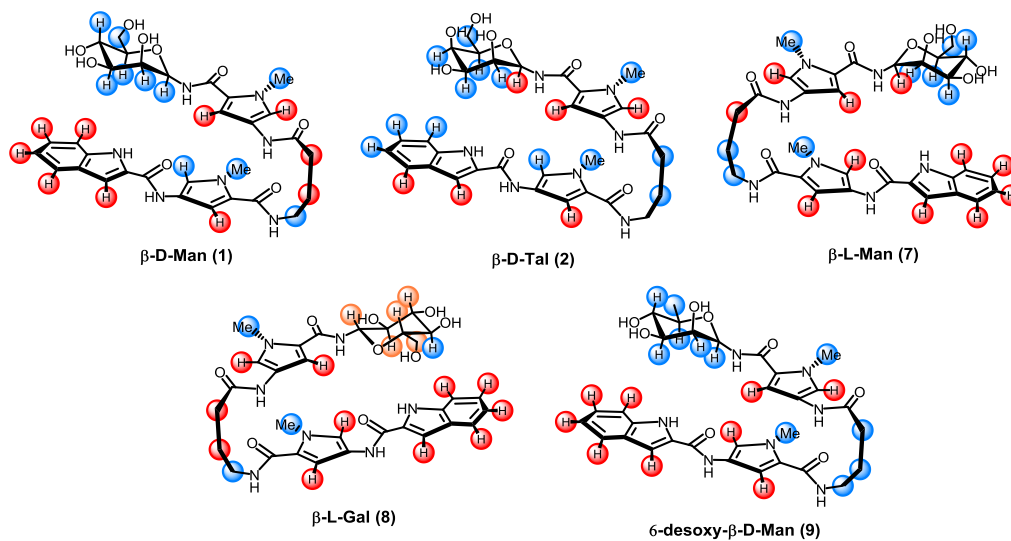
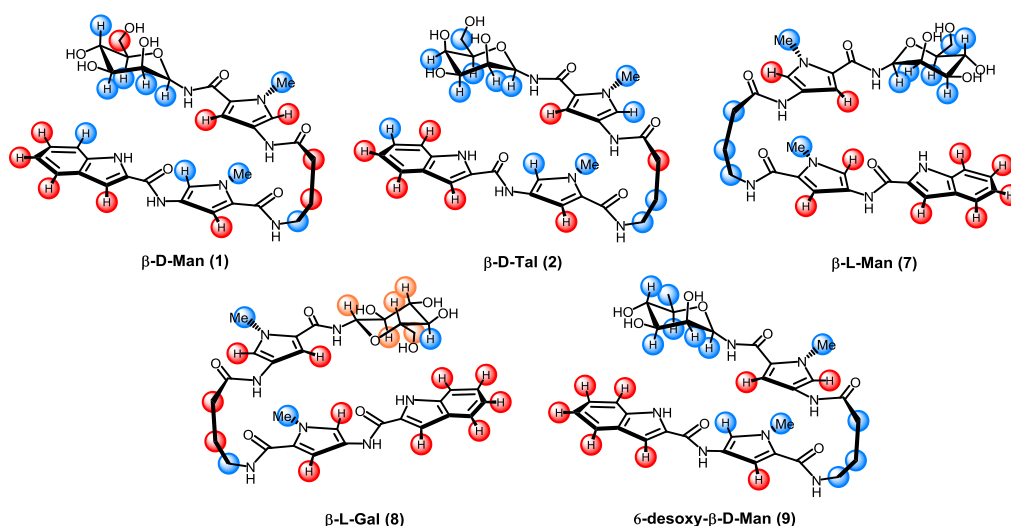
Experimentos DF-STD con poly(dA-dT)₂

Figura 5.22. Mapa de la relación de intensidades (I_f/I_d) obtenida de los resultados de DF-STD de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** con ct-ADN (arriba) y con poly(dA-dT)₂ (abajo). Las resonancias en rojo se corresponden con un valor de $I_f/I_d \leq 1.1$ indicando proximidad con el interior del surco menor de ct-ADN o poly(dA-dT)₂. Las resonancias mostradas en azul se corresponden con un valor de $I_f/I_d > 1.1$ indicando proximidad con el exterior del surco menor de ct-ADN. No fue posible medir la relación de intensidades en las resonancias mostradas en naranja debido al solapamiento con otras señales.

Como conclusión, los datos de DF-STD obtenidos presentan la misma distribución de saturación para las diferentes glico-oligoamidas tanto en complejos con ct-ADN como con

poly(dA-dT)₂. Esto indica que todas las glico-oligoamidas tienen el mismo modo de unión. (Ver figura 5.22).

Por un lado, la zona del arco NH estaría próxima a la región interna del surco menor ya que, en general las resonancias del anillo de indol y del protón Py-3^A ven más perturbada su intensidad cuando se satura H1' (resonancias en rojo). Por otro lado, los metilos CH₃^A y CH₃^B así como el fragmento sacarídico se sitúan en la zona externa del surco menor (resonancias en azul). Estos resultados, están de acuerdo con la existencia de una conformación de los ligandos estudiados en esta tesis **1**, **2** y **7-9**, en los que existe un arco NH (orientado hacia el interior del surco) y un arco N-Me (orientado hacia el exterior del surco). Esta conformación es análoga a la que adoptan glico-oligoamidas^[16,24] y miméticos de glicoproteínas previamente estudiadas en nuestro grupo^[33] y a las oligoamidas de Dervan.^[34]

También, los experimentos STD han concluido que en todos los casos la saturación es transferida desde la región del surco menor del ADN al carbohidrato, es decir que el carbohidrato se encuentra en el surco menor. Sin embargo, considerando la molécula de forma global los valores de I_f/I_d revelan que el fragmento sacarídico se encuentra más cerca del exterior del surco menor que del interior ya que $I_f/I_d > 1.1$.

Por otro lado, si analizamos únicamente los valores de I_f/I_d de la unidad sacarídica, encontramos una tendencia diferente en el valor de I_f/I_d , (más cercano o más alejado a 1), entre las resonancias de un mismo carbohidrato. Este valor depende de la naturaleza del azúcar y del polímero de ADN con el que forma el complejo.

En la figura 5.23 se muestra la relación de intensidades (I_f/I_d) de las resonancias de los carbohidratos irradiando en H1' y H4', H5' y H5'' del ct-ADN (Figura 5.23 arriba) y poly(dA-dT)₂ (figura 5.23 abajo).

Los valores más pequeños de I_f/I_d se corresponden con los más cercanos al interior del surco menor (en rojo). Los valores más grandes se corresponden con los más alejados del interior del surco (en azul). (Ver figura 5.23).

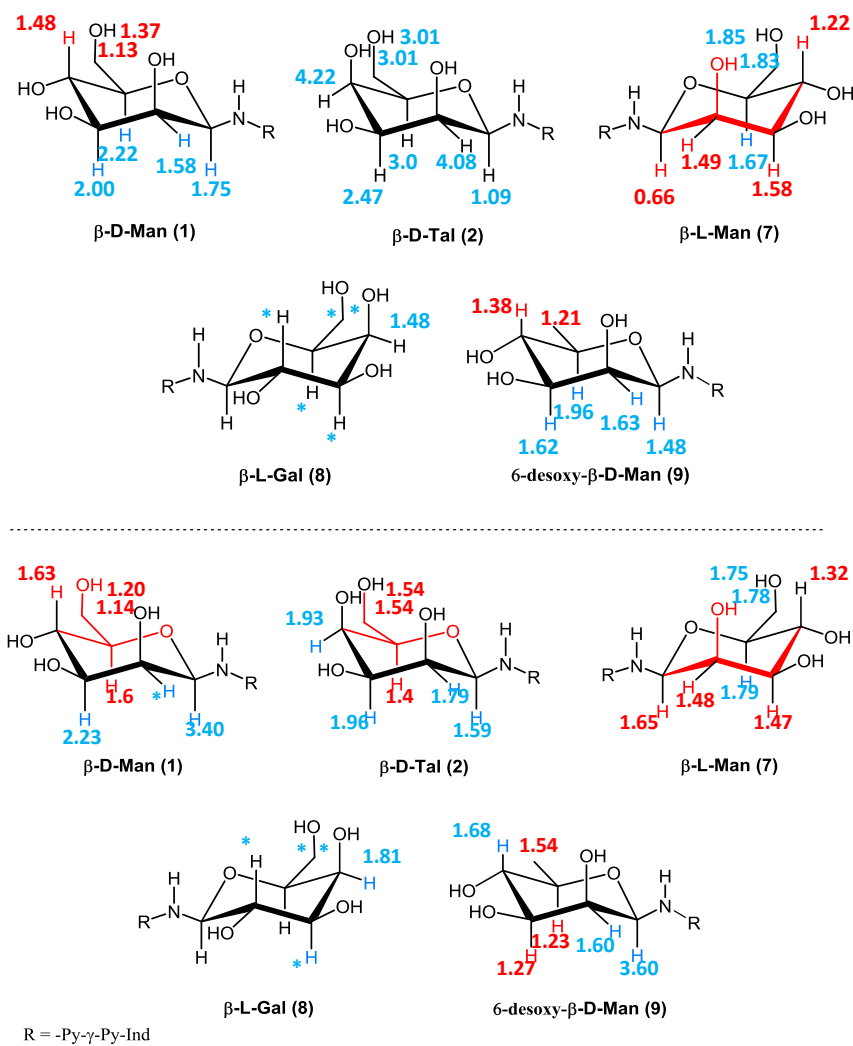


Figura 5.23. Relación de intensidades I_f/I_d en el fragmento carbohidrato en los complejos de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** con ct-ADN (arriba) y poly(dA-dT)₂ (abajo).^j

^j No se pudo determinar con exactitud las intensidades de las resonancias de los protones sacarídicos de la glico-oligoamida **β -L-Gal (8)** (con asterisco) por mostrar un solapamiento considerable en el espectro de ¹H-RMN.

Así, puede observarse que para **β -D-Man (1)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)**, en el complejo con ct-ADN, las resonancias de los protones situados en la cara β del carbohidrato (en rojo) se orientarían más cerca del interior del surco menor del ct-ADN que en el caso de los protones de la cara α (en azul). (Ver figura 5.23).

Por otro lado, en **β -L-Man (7)** los centros C2 y C3 del carbohidrato tienen unos valores de I_f/I_d ligeramente más bajos que C5 y C6 sugiriendo que su disposición está más cercana al interior del surco.

En el caso de los complejos con poly(dA-dT)₂ encontramos que los carbohidratos de manosa en **1** y talosa en **2** orientan los centros C5 y C6 más cerca del interior del surco menor. Sin embargo, en el caso de **β -L-Man (7)**, C2 y C3 muestran una ligera cercanía hacia el interior del surco.

De los resultados de los experimentos DF-STD junto con los obtenidos de los TR-NOESY podemos proponer, a modo de resumen, las siguientes estructuras de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** en los complejos con ct-ADN y poly(dA-dT)₂. (Ver figura 5.24).

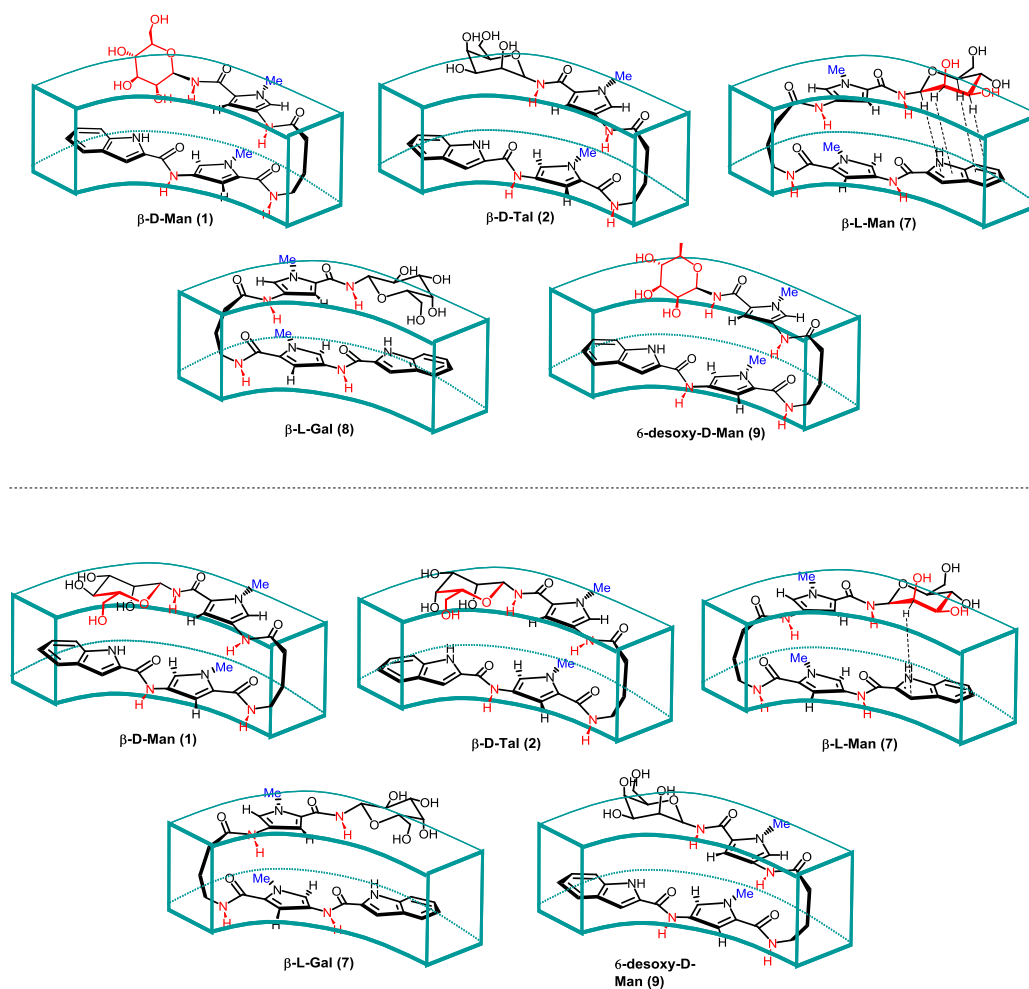


Figura 5.24. Resultados de los experimentos TR-NOESY y DF-STD para los complejos de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** con ct-ADN (arriba) y poly(dA-dT)₂ (abajo). Aparecen señalados en rojo los centros de las glico-oligoamidas que en el complejo, quedan orientados hacia el interior (rojo) y hacia el exterior (azul) del surco menor del ct-ADN.

En el caso de las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** la estructura del ligando en el complejo con ct-ADN no se puede asociar a ninguna de las propuestas en los esquema 1.1 y 1.3 del capítulo 1 (páginas 49 y 53) ya que no observamos nOes inter-hebra carbohidrato indol (por TR-NOESY) ni definición de los lados del carbohidrato hacia el interior o exterior del surco menor del ct-ADN (por STD).

En el caso de los complejos de **β -D-Tal (2)** y **β -L-Gal (8)** con ct-ADN, la ausencia de nOes inter-hebra carbohidrato indol y la falta de definición de orientación de los centros del carbohidrato nos impiden obtener información acerca del tipo de estructura, (A-D para la glico-

oligoamida **2** y A'-D' para la glico-oligoamida **8**) de estas glico-oligoamidas en el estado enlazado a ct-ADN.

Sin embargo, en el caso de la glico-oligoamida **β -L-Man (7)**, la información obtenida de los experimentos TR-NOESY y STD ha permitido definir el sentido del plegamiento de dicho ligando en su unión a ct-ADN. Así, los nOes inter-hebra carbohidrato-indol del TR-NOESY revelaron la cercanía de la cara alfa del azúcar al indol. Por otro lado, los STD del fragmento sacarídico sugieren la disposición de los centros C2 y C3 cercanos al interior del surco menor. Estos datos apuntan a un sentido de plegamiento C-N, en la dirección 5'-3' de la doble hélice, en su unión al surco menor de ct-ADN.

Si nos fijamos en los esquemas 1.2 y 1.3 del capítulo 1 (páginas 51 y 53) observamos que la glico-oligoamida de L-Manosa **7** adopta una estructura A' en el estado enlazado a ct-ADN. (Ver figuras 5.25 y 5.26).

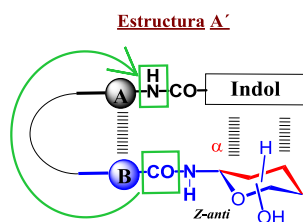


Figura 5.25. Estructura A' de la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** en el complejo con ct-ADN. Sentido del plegamiento C-N con la cara α del carbohidrato cercana al indol y los centros C-2 y C-3 hacia el arco NH orientados hacia el interior del surco menor.

En la figura 5.26 se representa el modo de unión de la glico-oligoamida **7** en el complejo con una secuencia de ct-ADN modelo que se corresponde con una estructura A1' propuesta en el capítulo 1 (ver figura 1.53 del capítulo 1, página 56).

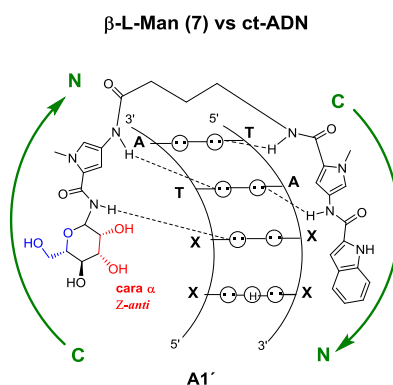


Figura 5.26. Modo de unión para la glico-oligoamidas **β -L-Man (7)** en el estado enlazado a ct-ADN. X = cualquier base nitrogenada del ct-ADN.

Los experimentos DF-STD apuntan a que puede haber una estructura predominante en los múltiples complejos con diferentes secuencias en el ct-ADN que disponen el OH-2 cooperativo de **β -L-Man (7)** hacia el interior del surco.

En relación a los complejos con poly(dA-dT)₂, en el caso de las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** no se encontraron nOes inter-hebra carbohidrato-indol en los experimentos tr-NOESY, como ya vimos en el apartado 5.3.1 de este capítulo. Esto no nos permite la definición del tipo de plegamiento de dichas glico-oligoamidas. Sin embargo, los experimentos DF-STD revelan una preferencia de orientación de los lados del carbohidrato respecto del interior del surco menor del poly(dA-dT)₂ (ver figuras 5.23 y 5.24). Así, los centros O5, C5 y C6 de **1** y **2** se orientan más cerca del interior del surco menor del ADN. (Ver figuras 5.23 y 5.24).

En el caso del complejo **β -L-Man (7)**/poly(dA-dT)₂ también fue posible definir el mismo sentido de plegamiento C–N del ligando. La existencia del nOe H-2/Ind-3 entre la cara α del carbohidrato y el anillo de indol (ver figuras 5.19 de este capítulo y 9.14 del anexo) junto con los resultados de los experimentos DF-STD, muestran que C2 y C3 de **7** se orientan más hacia el interior del surco. Estos datos estructurales hacen posible la propuesta de una estructura A' de **β -L-Man (7)** en el surco menor de poly(dA-dT)₂. (Ver figura 5.27).

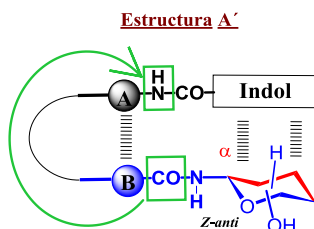


Figura 5.27. Estructura A' de la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** en el complejo con poly(dA-dT)₂. Sentido del plegamiento C–N con la cara α del carbohidrato cercana al indol y los centros C-2 y C-3 hacia el arco NH orientados hacia el interior del surco menor.

Así, en el estado enlazado a poly(dA-dT)₂ podemos proponer el siguiente modo de unión de la glico-oligoamida **7** que se corresponde con una estructura A1' del complejo. (Ver figura 5.28 y figura 1.53 del capítulo 1, página 54).

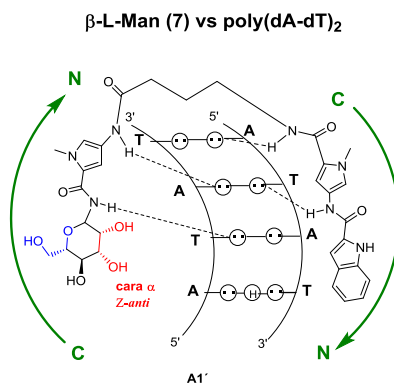


Figura 5.28. Modo de unión de la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** en el estado enlazado a poly(dA-dT)₂.

Este resultado apunta de nuevo a que la glico-oligoamida **7** podría orientar el centro dador de EH cooperativo OH-2 hacia el interior del surco menor de poly(dA-dT)₂.

5.4. Determinación de las constantes de asociación. Valoraciones de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7), β -L-Gal (8), 6-desoxy- β -D-Man (9) con poly(dA-dT)₂ por ¹H-RMN.

El objetivo de este apartado es el desarrollo de un método mediante ¹H-RMN para determinar el orden relativo de afinidades de las glico-oligoamidas en su interacción con poly(dA-dT)₂. De esta forma se pretende obtener información sobre la influencia del tipo de carbohidrato en dicha interacción en relación a:

1. La existencia de centros dadores de EH cooperativos en las glico-oligoamidas **β -D-Man (1) y β -D-Tal (2)** frente a glico-oligoamidas con centros dadores de EH no cooperativos **β -D-Glc (3) y β -D-Gal (4)**.
2. La diferencia de afinidad entre glico-oligoamidas enantioméricas en la formación de complejos diastereoméricos con el poly(dA-dT)₂. **β -L-Man (7) y β -L-Gal (8)** frente a **β -D-Man (1) y β -D-Gal (4)**
3. La diferencia de afinidad entre las glico-oligoamidas de la serie de manosa que contienen OH-2 como posible centro dador de EH cooperativo: **β -D-Man (1)** frente a **β -L-Man (7)** y frente a **6-desoxy- β -D-Man (9)**.

En definitiva, queremos comprobar si los diferentes carbohidratos modulan la interacción con poly(dA-dT)₂.

El protocolo utilizado para la estimación de un orden relativo de afinidades de las glico-oligoamidas en su interacción con poly(dA-dT)₂ está basado en el método utilizado para la estimación de afinidades proteína-ligando anteriormente descrito en la bibliografía.^[18a]

Este método correlaciona el cociente de intensidades (I_{obs}/I_0) de pico de ¹H-RMN del ligando, en presencia (I_{obs}) y ausencia de macromolécula (I_0), con la fracción de ligando complejoado (f_B). Así, cuando el ligando se une al ADN éste adoptará las propiedades de relajación de la macromolécula produciéndose un aumento de la anchura de línea de las resonancias del ligando y una disminución de la intensidad de la señal. (Figuras 5.29 y 5.30). Se espera que los ligandos con una mayor afinidad sufran una mayor disminución en la intensidad de las señales de ¹H-RMN al añadir cantidades crecientes de macromolécula.^[14b] Este parámetro ha sido utilizado, recientemente, por otros grupos para la estimación de constantes de asociación entre ligandos y proteínas.^[18a]

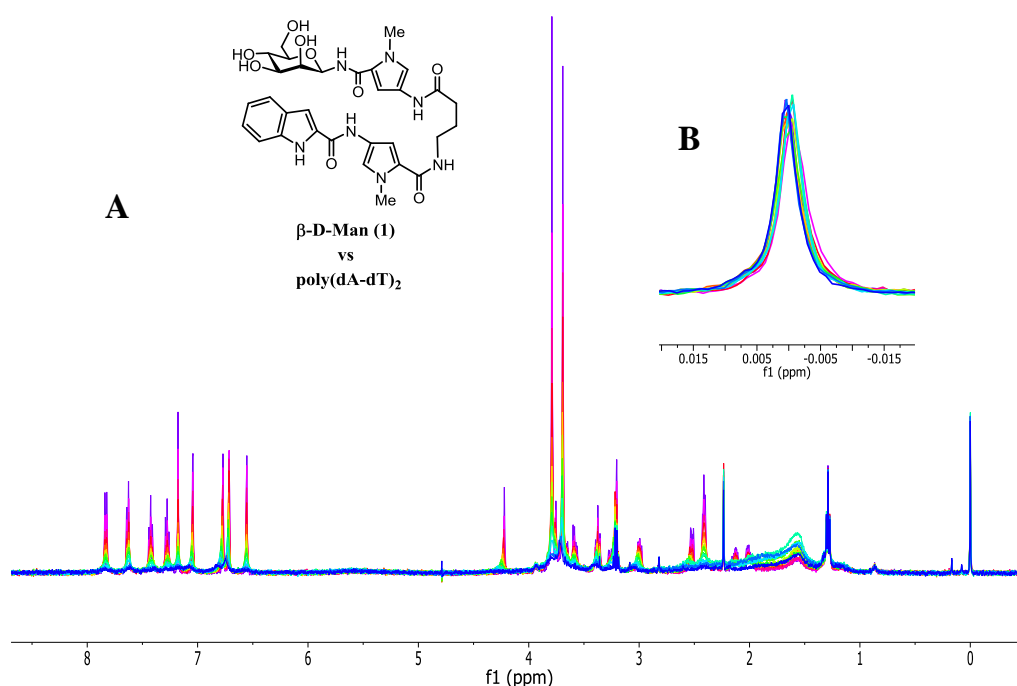


Figura 5.29. A) Superposición de espectros de la valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida **β-D-Man (1)** con poly(dA-dT)_2 . Se registraron varios espectros a diferentes relaciones molares DNA/Ligando. Espectro violeta en ausencia de ADN. La concentración del ligando **1** ($c = 200 \mu\text{M}$) se mantiene constante durante la valoración. B) Ampliación de la señal de la referencia TSP- d_4 . Todos los espectros fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1 = 5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) a 25°C . Referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

Como puede observarse en las figuras 5.29 y 5.30, al ir añadiendo cantidades crecientes de ADN se produjo el ensanchamiento de las resonancias del ligando y una disminución en la intensidad. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en la anchura de línea de las resonancias tanto de la referencia interna TPS- d_4 , (a 0.00 ppm, figura 5.15 B), como de una impureza observada en el espectro, (1.25 ppm), descartándose que el aumento de viscosidad en el medio afecte a la anchura de línea observada en las resonancias del ligando.

Por lo tanto, para determinar un orden de afinidades de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** en su interacción con el ADN, se llevaron a cabo una serie de valoraciones de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** con poly(dA-dT)_2 en D_2O (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) a 25°C .

En cada valoración se registró un primer espectro de la disolución de las glico-oligoamidas correspondiente a una concentración^k entorno a 90-250 μM , y después se añadieron cantidades crecientes de una disolución de poly(dA-dT)₂, ($c \sim 4 \text{ mM}$),^l conteniendo el ligando en la misma concentración que la disolución a valorar. De esta forma, la concentración de ligando se mantiene constante durante la valoración y así la desaparición de la señal únicamente se debe a la unión y no a la dilución de la muestra.

Tras cada adición de ADN, se registró un espectro de ¹H-RMN (Ver figura 5.31). Los espectros de ¹H-RMN de todas las valoraciones presentadas en este trabajo se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz) a 25 °C utilizando siempre el mismo número de scans, ($ns = 64$), para cada espectro y manteniendo constante el valor de la ganancia del espectrómetro. En todos los experimentos se utilizó un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos, ($d1 = 5s$), para permitir que los espines vuelvan al equilibrio térmico, condición necesaria para realizar un análisis cuantitativo de la intensidad e integración de las señales a lo largo de las valoraciones. Los espectros de las valoraciones con poly(dA-dT)₂ realizados con el resto de los compuestos se muestran en el anexo (ver figuras 9.22 – 9.27 del anexo).

^k La concentración de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** se determinó por ¹H-RMN, mediante la comparación de integrales respecto de un patrón interno. El patrón interno utilizado fue TSP-d₄ (0.00 ppm, $c = 100 \mu\text{M}$).

^l La concentración de poly(dA-dT)₂ fue calculada por espectroscopia UV/Vis usando el coeficiente de extinción molar descrito en la bibliografía. $\epsilon^{262\text{nm}} \text{ poly(dA-dT)}_2 = 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (concentración en pares de bases).^[3]

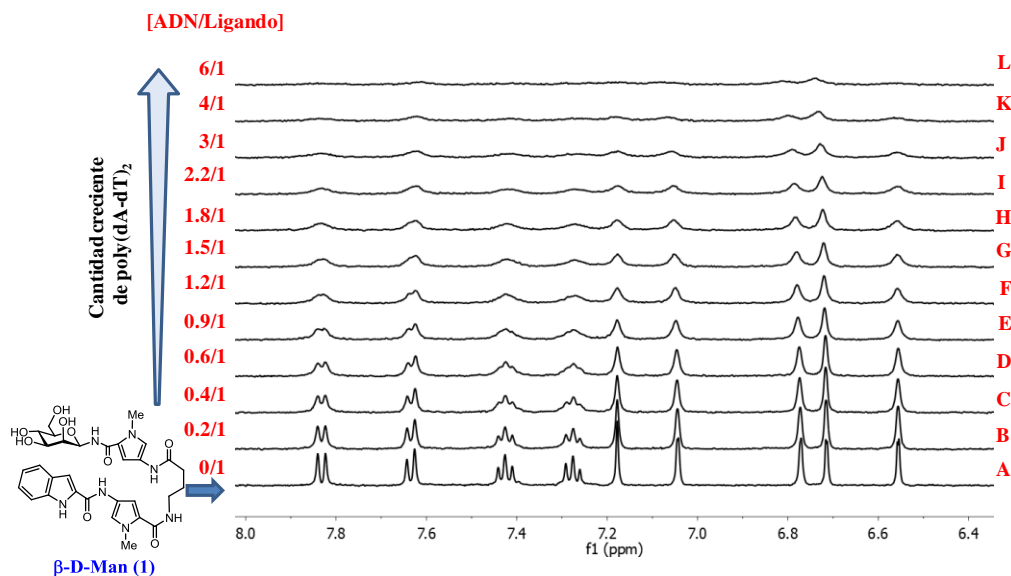


Figura 5.30. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida **β -D-Man (1)** con $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$. En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando (desde 0 hasta 6, A-L), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de **1** ($c=250\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$: Espectros B-L: B) $50\ \mu\text{M}$ (bp), C) $100\ \mu\text{M}$ (bp), D) $150\ \mu\text{M}$ (bp), E) $225\ \mu\text{M}$ (bp), F) $300\ \mu\text{M}$ (bp), G) $375\ \mu\text{M}$ (bp), H) $450\ \mu\text{M}$ (bp), I) $550\ \mu\text{M}$ (bp), J) $750\ \mu\text{M}$ (bp), K) $1000\ \mu\text{M}$ (bp) L) $1500\ \mu\text{M}$ (bp) de $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$. Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando **1** con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP-d4 ($0.00\ \text{ppm}$).

Posteriormente se midieron las intensidades relativas (I_{obs}/I_0) de las resonancias de los diferentes protones (Ind-3, Py-5^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B) de las glico-oligoamidas a valorar. Las intensidades relativas (I_{obs}/I_0) de cada una de las resonancias del ligando se calcularon con respecto a la intensidad observada del ligando (I_0) en ausencia de $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$. Las intensidades de las resonancias del ligando en ausencia de ADN se normalizaron al valor de 1.00.

En la figura 5.31 se representa la disminución de la intensidad relativa (I_{obs}/I_0) frente a la relación molar ($\text{poly}(\text{dA-dT})_2/\text{ligando}$) de las resonancias de diferentes protones (Ind-3, Py-5^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B) para cada una de las glico-oligoamidas que fueron valoradas (**1-4** y **7-9**).

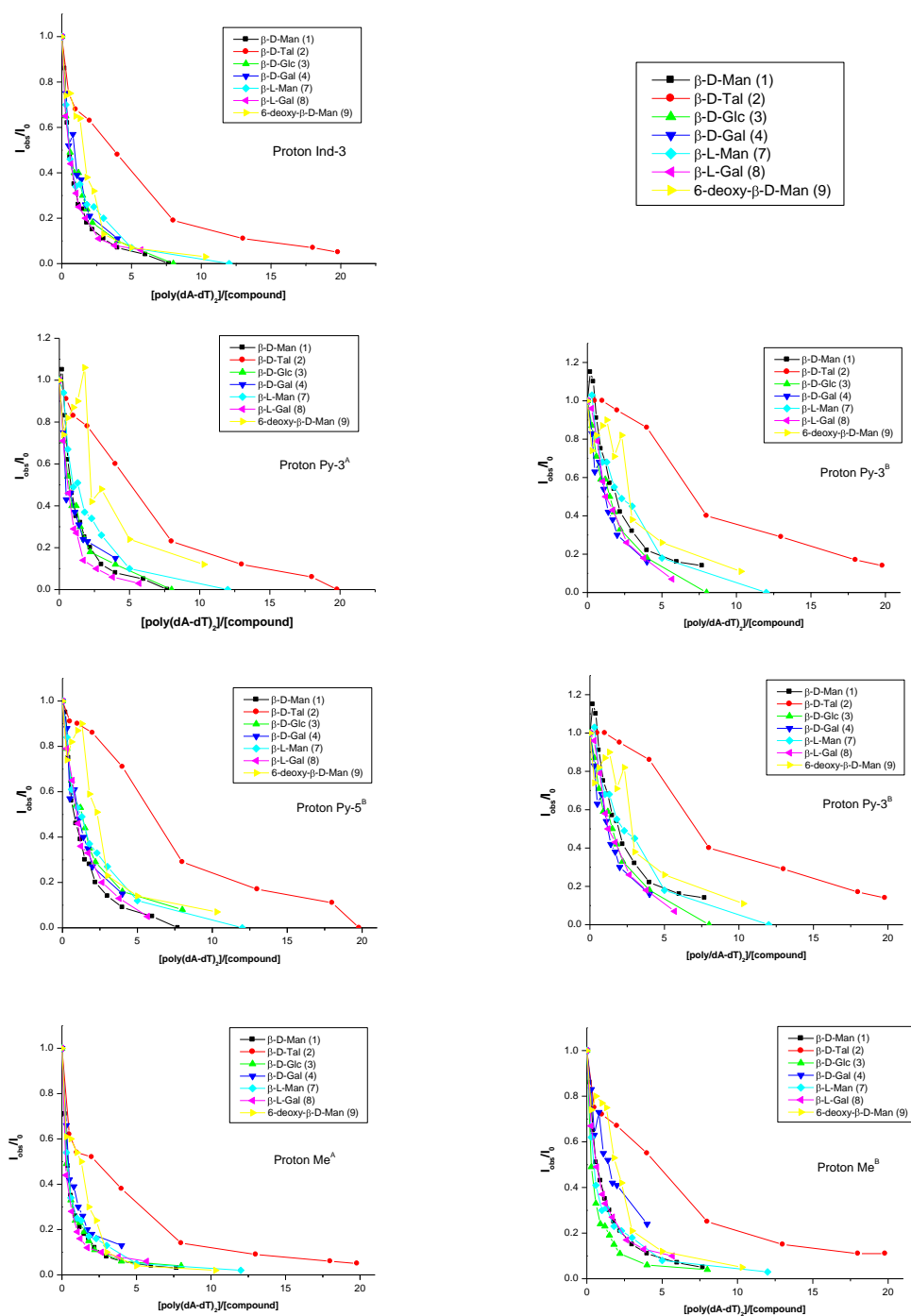


Figura 5.31. Valoraciones de las glico-oligoamidas (1-4 y 7-9) vs poly(dA-dT)₂. Representación de la disminución de la intensidad relativa (I_B/I_F) frente a la relación molar (poly(dAdT)₂/Ligando) de algunas de las resonancias aromáticas Ind-3, Py-5^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B de las glico-oligoamidas.

Las líneas sólidas corresponden al mejor ajuste obtenido a la ecuación 3 manteniendo fijo el parámetro c para cada tipo de protón y dejando como parámetros ajustables K_D y n . Todos los espectros de ^1H -RMN fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) a 25°C . Referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

Las constantes de equilibrio de disociación (K_D) han sido estimadas siguiendo un procedimiento basado al descrito por Shortridge et al.^[18a] en el que utilizan la Ecuación 1 para el ajuste de los datos obtenidos en las valoraciones:

$$\frac{I_{obs}}{I_0} = \frac{1}{1 + cf_B}$$

Ecuación 1 propuesta por Shortridge et al.^[18a]

Donde f_B es la fracción molar de ligando unido y se puede expresar en términos de K_D y $[P]$ de la siguiente forma:

$$f_B = \chi_{LP} = \frac{[LP]}{[L]_{total}} = \frac{[LP]}{[L] + [LP]} \Rightarrow \text{Fracción molar de ligando unido en disolución}$$

$$\left. \begin{aligned} [LP] &= \frac{[L] \cdot [P]}{K_D} \\ \chi_{LP} &= \frac{[LP]}{[L]_{total}} = \frac{[LP]}{[L] + [LP]} \end{aligned} \right\} \chi_{LP} = \frac{[L] \cdot [P]}{K_D \cdot ([L] + [LP])} = \frac{[P]}{K_D + [P]}$$

$$\chi_{LP} = \frac{[L] \cdot [P]}{K_D \cdot ([L] + [LP])} = \frac{[P]}{K_D + [P]}$$

Ecuación 2

La Ecuación 2 se puede expresar en términos de concentración de ADN total añadido durante la valoración mediante la aproximación:

$$[P]_{total} = [P] + [PL] \Rightarrow [P] = [P]_{total} - [PL]$$

$$\text{Aproximación: Si } [P]_{total} \gg [PL] \text{ entonces } [P] \approx [P]_{total}$$

De forma que la fracción molar de ligando unido se puede expresar en términos de K_D y $[P]_{total}$:

$$\chi_{LP} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \approx \frac{[P]_{total}}{K_D + [P]_{total}}$$

Así, en esta tesis doctoral como ya se propuso anteriormente en nuestro grupo en la Tesis Doctoral del Dr. Rafael del Villar Guerra, se presenta una ecuación alternativa a la Ecuación 1 propuesta por Shortridge et al para realizar el ajuste de los datos de las valoraciones. (Ecuación 3).

$$\frac{I_{obs}}{I_0} = \frac{1}{1 + \frac{c \cdot [P]_T}{[P]_T + K_D}}$$

Ecuación 3 propuesta en esta Tesis Doctoral

Todas las aproximaciones realizadas para una completa deducción de la Ecuación 3 se explican en el anexo (página 327). Estas curvas de intensidad relativa (I_{obs}/I_0) frente a la concentración de ADN, (figura 5.32), muestran una isoterma de unión que se puede ajustar a la Ecuación 3 mediante una regresión no lineal, utilizando el programa Microcal Origin 6.0 (Origin Lab Corp., Northampton, MA). De esta forma, se obtiene una estimación de la constante de equilibrio de disociación (K_D).

Las Ecuaciones 1 y 3 están expresadas en términos de la concentración total de macromolécula añadida $[P]_T$ y la concentración total del ligando $[L]_T$. I_{obs} y I_0 representan las intensidades de las resonancias del ligando en presencia y en ausencia de ADN respectivamente. El parámetro adimensional (c) se define como $c = (v_B/v_F - 1)$, donde v_F y v_B corresponden con la anchura de línea de las resonancias del ligando en el estado libre y asociado respectivamente. El cociente de anchura de línea (c) representa el cambio proporcional en la anchura de línea del ligando cuando se está uniendo a la macromolécula y actúa como un factor de escala en el cálculo de la constante de disociación (K_D). Debido a la completa covarianza entre c y K_D , se requiere una estimación del valor de c para calcular la constante de disociación a partir de estas curvas de valoración por $^1\text{H-RMN}$.^[18a] Por lo tanto, una estimación incorrecta de este parámetro (c) dará como resultado que se sobrestime o subestime de manera sistemática el valor real de la K_D . Sin embargo, el orden relativo de afinidades se mantendrá si se utiliza un mismo valor del parámetro c para cada uno de los ligandos. La ecuación 3 se deriva de un modelo de interacción para un complejo de estequiometría 1:1.

La ecuación 3 presupone que tanto las diferencias de desplazamiento químico, entre el estado libre y asociado, como el proceso de intercambio no contribuyen de manera significativa a los cambios de la anchura de línea observada a lo largo de la valoración,^[18a]

Estas aproximaciones son válidas, en nuestro caso, debido principalmente a dos razones. En primer lugar, cálculos de cuantificación de constantes de asociación por RMN, realizados previamente en nuestro grupo,^[33] entre miméticos de factores de transcripción con poly(dA-dT)₂, siguiendo este mismo protocolo, pusieron de manifiesto que los miméticos de factores de transcripción poseen afinidades pequeñas ($K_a < 1000 \text{ M}^{-1}$). Debido a que los miméticos de factores de transcripción tienen una estructura similar a las glico-oligoamidas objeto de estudio de esta tesis, es lógico pensar que éstas se encuentran, también, en un régimen de intercambio rápido donde el cambio en la anchura de línea del ligando estará dominado por la anchura de línea del ADN utilizado. Bajo estas circunstancias, se puede utilizar un mismo valor del parámetro c , para cada tipo de protón, de todas las glico-oligoamidas, debido a que en todas las valoraciones se va a usar el mismo tipo de ADN, poly(dA-dT)₂.

En segundo lugar, las glico-oligoamidas interaccionan con el surco menor del ADN de un modo similar,^m como se ha podido comprobar con los experimentos de competición con Netropsina (ver apartado 5.2.1). Debido a este hecho, el ligando debería experimentar una contribución relativamente constante en lo que respecta a la contribución del desplazamiento químico y el proceso de intercambio. Por lo tanto, la contribución de los anteriores factores no debería influir en el orden de afinidades relativas cuando se utiliza la medida de la intensidad de la señal como aproximación experimental para el cálculo de constantes de afinidad.^[18a]

En resumen, suponemos que los cambios observados en la anchura de línea, y por lo tanto en la intensidad de las resonancias de los protones del ligando se atribuye fundamentalmente al diferente valor de las constantes de asociación de las glico-oligoamidas.

Los valores de K_D se han obtenido por regresión no lineal de los datos experimentales utilizando la Ecuación 3. En el ajuste de los datos se ha mantenido fijo el parámetro c para cada tipo de protón y se ha dejado como parámetro ajustable K_D .

Para cada tipo de protón de los diferentes compuestos **1-4** y **7-9** el ajuste se ha realizado utilizando el mismo valor del parámetro de anchura de línea (c).

En la tabla 5.1 se detallan los valores de concentración total de ligando y del parámetro de anchura de línea (c) utilizados en el ajuste. Se utiliza un distinto valor de (c) para cada protón debido al diferente entorno químico de cada uno de ellos en el estado asociado al

^m Este hecho se comprobó que era cierto mediante los experimentos de competición con Netropsina (apartado 5.2.1) y experimentos TR-NOESY y STD.

ADN, por lo que las propiedades de relajación de cada protón son ligeramente diferentes. Así, en esta tesis se ha empleado cada tipo de protón el valor del parámetro “c” previamente calculado para los miméticos de factores de transcripción estudiados en nuestro grupo^[33] para los protones Ind-3, Py-5^A, Py-3^A, Py-5^B y Py-3^B. Dichos factores de transcripción poseen una estructura y modo de unión al ADN similar al de las glico-oligoamidas objeto de estudio de esta tesis.

Teniendo en cuenta que en ningún caso se puede llegar a saturación, el valor del parámetro c utilizado, para cada tipo de protón, corresponde a un valor igual o superior al calculado de cⁿ para las concentraciones de ADN máximas utilizadas durante las valoraciones de todos los compuestos.

Los valores de constante de disociación K_D obtenidos en el ajuste de los datos, para las diferentes resonancias (Ind-3, Py-5^A, Py-3^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B) de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** se muestran en la tabla 5.1.

ⁿ El valor de c se calcula mediante la expresión: $c = (I_F/I_B) - 1$.^[18a]

Tabla 5.1. Valores de las constantes de disociación K_D obtenidos en el ajuste de los datos, para diferentes resonancias Ind-3, Py-5^A, Py-3^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B de las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** en su interacción con poly(dA-dT)₂.

Tipo de protón	c	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)	β -L-Man (7)	β -L-Gal (8)	6-desoxy- β -D-Man (9)
Ind-3	40	3.2	7.0	1.6	3.6	1.2	2.4	6.6
Py-5 ^A	25	2.7	7.2	1.0	2.3	1.3	1.6	7.0
Py-3 ^A	22	2.5	5.6	0.6	1.4	1.3	0.9	11.2
Py-5 ^B	13	1.3	3.9	0.6	1.1	0.2	1.0	3.2
Py-3 ^B	10	3.2	5.6	0.6	1.1	0.9	1.4	4.1
Me ^A	55	2.9	5.6	0.9	3.3	0.7	1.5	5.7
Me ^B	30	3.0	6.7	1.1	5.6	0.3	2.4	7.2
K_D promedio (mM) ^{a,b}		2.7±0.2	5.9±0.3	0.9±0.04	2.6±0.1	0.85±0.1	1.6±0.1	6.4±1.1
[Ligando] total (μM)		250	90	100	150	100	190	170

a) La concentración de la constante de asociación K_D está expresada en mM pares de bases (bp).

b) Los errores fueron calculados como al desviación estándar de los diferentes valores de K_D obtenidos para cada protón.

Los valores de constantes de asociación K_a calculados que aparecen en la tabla 5.2 son la media aritmética de todos los valores medidos para las diferentes resonancias. Estos valores nos permiten establecer un orden de afinidades relativas.

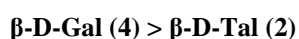
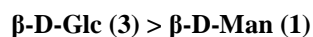
Tabla 5.2. Valores de constantes de asociación K_a obtenidos en el ajuste de los datos para las glico-oligoamidas **1-4** y **7-9** en su interacción con poly(dA-dT)₂.

Tipo de protón	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)	β -L-Man (7)	β -L-Gal (8)	6-desoxy- β -D-Man (9)
K_a promedio (M) ^{a,b}	373±33	168±3	1098±45	384±20	1176±124	637±36	156±25
[Ligando] total (μM)	250	90	100	150	100	190	170

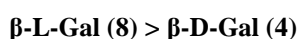
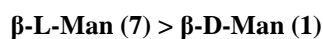
El protón Ind-3, en todos los compuestos, es el que experimenta un mayor incremento de anchura de línea a medida que se añaden cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂.

Por otro lado, los protones Py-3^A y Py-5^A sufren un mayor ensanchamiento que los protones Py-3^B y Py-5^B. Como se mencionó anteriormente, esto sugiere una mayor proximidad espacial a la superficie del ADN de los protones que de los Ind-3, Py-3^A y Py-5^A que de los Py-3^B y Py-5^B.

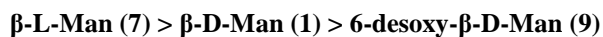
Las glico-oligoamidas con centros dadores de EH no cooperativos **β-D-Glc (3)** y **β-D-Gal (4)** tienen una mayor afinidad por poly(dA-dT)₂ que las correspondientes glico-oligoamidas con centros dadores de EH cooperativos **β-D-Man (1)** y **β-D-Tal (2)**.



Las glico-oligoamidas que contienen carbohidratos de la serie L con centros dadores de EH cooperativos **β-L-Man (7)** y no cooperativos **β-L-Gal (8)** poseen una mayor afinidad por poly(dA-dT)₂ en comparación con sus correspondientes glico-oligoamidas que contienen D-carbohidratos con centros dadores de EH cooperativos **β-D-Man (1)** y no cooperativos **β-D-Gal (4)**.



En la serie de glico-oligoamidas de manosa el orden de afinidad es el siguiente:



Estos resultados apuntan a que existe una correlación entre la afinidad de las glico-oligoamidas derivadas de manosa (**1**, **7** y **9**) y la orientación del centro dador de EH cooperativo OH-2. Así, la orientación de dicho centro más hacia el interior del surco menor del poly(dA-dT)₂, en el caso de **β-L-Man (7)**, está de acuerdo con una mayor afinidad de dicha glico-oligoamida por el poly(dA-dT)₂.

Así, podemos concluir que:

- Se ha llevado a cabo la determinación de un orden relativo de afinidades de las glico-oligoamidas en su interacción con poly(dA-dT)₂ mediante ¹H-RMN.

- La naturaleza del carbohidrato y su estereoquímica modulan la interacción de la glico-oligoamidas con poly(dA-dT)₂
- El polímero de ADN poly(dA-dT)₂ prefiere unirse a glico-oligoamidas que contengan el hidroxilo en configuración ecuatorial que a glico-oligoamidas cuyo OH-2 está en posición axial.
- El polímero de ADN poly(dA-dT)₂ prefiere unirse a glico-oligoamidas que contengan carbohidratos de la serie L a la serie D.
- La unión de glico-oligoamidas de manosa con 6-desoxy carbohidratos desfavorece el proceso de asociación a poly(dA-dT)₂.

5.4.1. Estudios de interacción mediante experimentos de competición entre dos ligandos con poly(dA-dT)₂.

El objetivo de estos experimentos es poder validar el protocolo anterior de determinación de las constantes de afinidad por ¹H-RMN como un método para poder establecer un orden relativo de afinidades de los ligandos por poly(dA-dT)₂.

Como se ha comentado antes, las valoraciones de las glico-oligoamidas con poly(dA-dT)₂ han puesto de manifiesto que el fragmento carbohidrato modula la interacción con el ADN. Así, para obtener una información que apoye los resultados obtenidos, mediante el cálculo de las constantes de afinidad relativas, se han realizado una serie de experimentos de competición con diferentes parejas de compuestos y poly(dA-dT)₂.

En estos experimentos de competición se mantienen iguales, para los dos compuestos a lo largo de la valoración, ciertas variables experimentales como son: la viscosidad, el peso molecular promedio del ADN utilizado, la relación de concentración de los ligandos utilizada en la valoración y la precisión en la medida de las intensidades relativas de cada pico, fundamentalmente en los puntos finales de la valoración donde es menor la relación señal/ruido. Por lo tanto, las diferencias observadas durante el experimento de competición serían, en principio, solamente atribuibles a las diferencias en constantes de afinidad de ambos compuestos hacia el poly(dA-dT)₂.

De acuerdo a nuestros objetivos, mediante estos experimentos de competición, por un lado, queremos comprobar la influencia de la red de EH intramolecular, en cuanto a afinidad por poly(dA-dT)₂ se refiere, en las glico-oligoamidas de manosa, **β-D-Man (1)**, y talosa, **β-D-Tal (2)**, con centros dadores de EH cooperativos, frente a glico-oligoamidas de glucosa, **β-D-**

Glc (3), y galactosa, **β -D-Gal (4)**, respectivamente, con centros dadores de EH no cooperativos. (Ver figuras 5.33 y 5.34).

Por otro lado estos experimentos de competición nos permitieron evaluar la diferencia de afinidad entre los derivados de manosa **β -D-Man (1)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** como veremos a continuación.

Estos estudios de interacción consistieron en registrar un primer espectro de ^1H -RMN de una disolución conteniendo los dos ligandos en la misma concentración (espectro C en figuras 5.33, 5.34 y 5.35). A continuación, sobre la disolución anterior se añadieron cantidades crecientes de una disolución de poly(dA-dT)₂ (c~6 mM), registrando un espectro tras cada adición de ADN (espectro D en adelante de las figuras 5.33, 5.34 y 5.35). Se registraron normalmente entre 2 y 4 espectros en presencia de ADN. De esta manera, las resonancias del compuesto que posee una mayor afinidad por poly(dA-dT)₂ sufren un mayor ensanchamiento y, por lo tanto, la intensidad de las resonancias disminuye de forma más notoria.

En la figura 5.33 se muestra el experimento de competición realizado entre **β -D-Man (1)** y **β -D-Glc (3)** con poly(dA-dT)₂.

Se observa que a medida que se añaden cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂ sobre la disolución mezcla de ligandos (**1+3**), las resonancias correspondientes a la glico-oligoamida de glucosa (**3**) (círculo rojo) (figura 5.33, C-E) se ensanchan antes que las resonancias de la glico-oligoamida de manosa (**1**) (círculo verde) (figura 5.33, C-E).

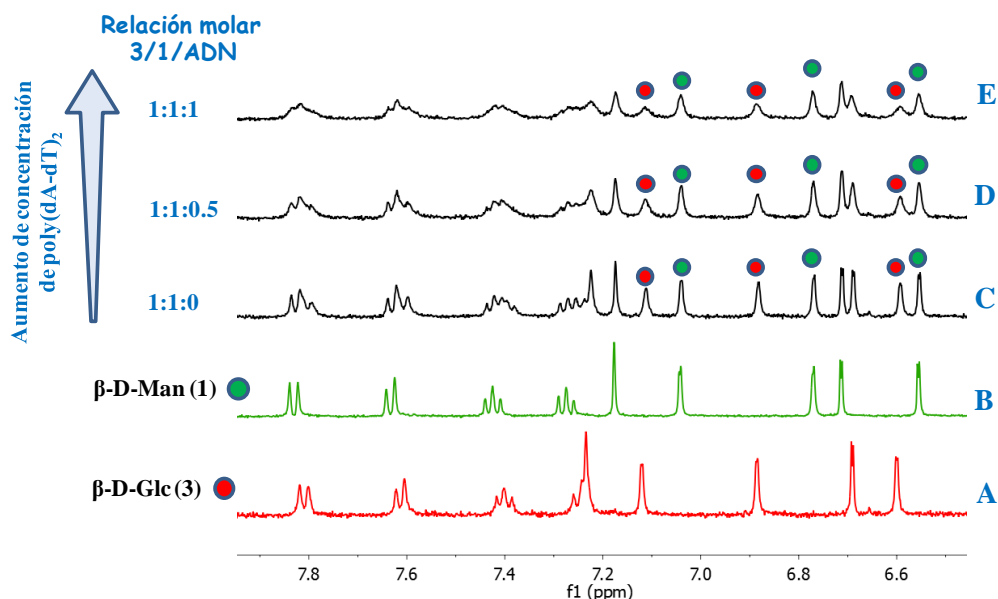


Figura 5.33. Experimento de competición entre **β -D-Man (1)** y **β -D-Glc (3)** con poly(dA-dT)₂. A) Ampliación del espectro ¹H-RMN de **β -D-Glc (3)** (rojo) en ausencia de ADN, B) Ampliación del espectro ¹H-RMN de **β -D-Man (1)** (verde) en ausencia de ADN, C) Espectro mezcla de **3** (c= 100 μ M) y **1** (c= 100 μ M) en ausencia de ADN, y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂ añadido (Espectros D-E): C) 50 μ M (bp), D) 100 μ M (bp) de poly(dA-dT)₂. Todos los espectros se registraron con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s) en D₂O tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

En la figura 5.34 se muestra el experimento de competición realizado entre **β -D-Tal (2)** y **β -D-Gal (4)** con poly(dA-dT)₂.

Se observa que a medida que se añaden cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂ sobre la disolución mezcla de ligandos (**2+4**), las resonancias correspondientes a la glico-oligoamida de galactosa (**4**) (círculo rojo) (figura 5.34, C-F) se ensanchan, antes que las resonancias de la glico-oligoamida de talosa (**2**) (círculo verde) (figura 5.34, C-F).

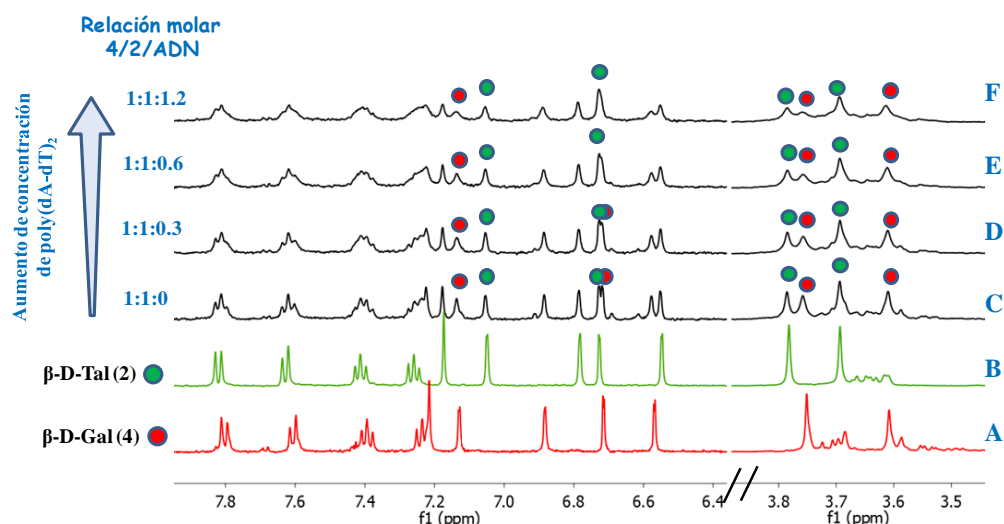


Figura 5.34. Experimento de competición entre β -D-Gal (1) y β -D-Tal (2) con poly(dA-dT)₂. A) Ampliación del espectro ¹H-RMN de β -D-Gal (4) (rojo) en ausencia de ADN, B) Ampliación del espectro ¹H-RMN de β -D-Tal (2) (verde) en ausencia de ADN, C) Espectro mezcla de 4 (c= 140 μ M) y 2 (c= 140 μ M) en ausencia de ADN, y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂ añadido (Espectros D-F): D) 42 μ M (bp), E) 84 μ M (bp), F) 168 μ M (bp) de poly(dA-dT)₂. Todos los espectros se registraron con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s) en D₂O tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

Finalmente, fue posible la realización del experimento de competición entre glico-oligoamidas derivadas de manosa con poly(dA-dT)₂: β -D-Man (1) vs 6-desoxy- β -D-Man (9). (Ver figura 5.35).

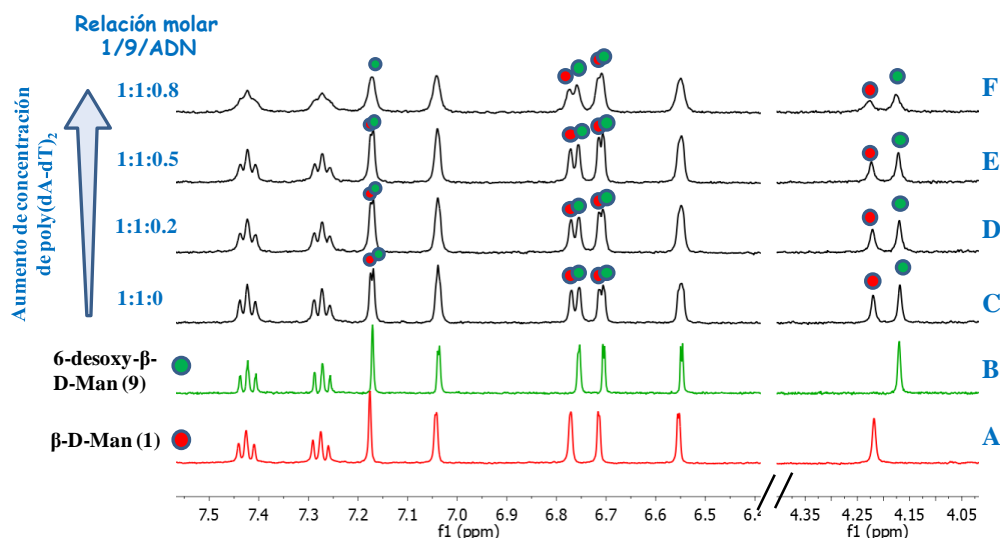
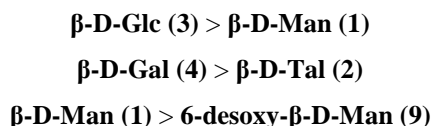


Figura 5.35. Experimento de competición entre **β -D-Man (1)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** con poly(dA-dT)₂. A) Ampliación del espectro ¹H-RMN de **β -D-Man (1)** (rojo) en ausencia de ADN, B) Ampliación del espectro ¹H-RMN de **6-desoxy- β -D-Man (9)** (verde) en ausencia de ADN, C) Espectro mezcla de **1** ($c = 155 \mu\text{M}$) y **9** ($c = 155 \mu\text{M}$) en ausencia de ADN, y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂ añadido (Espectros D-F): D) $31 \mu\text{M}$ (bp), E) $77 \mu\text{M}$ (bp), F) $124 \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT)₂. Todos los espectros se registraron con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1 = 5\text{s}$) en D₂O tampón fosfato ($6.1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C. Referencia TSP-d4 (0.00 ppm)

Así, aunque en este experimento de competición resulta más complicada la visualización del ensanchamiento de las señales debido a un mayor solapamiento entre las mismas, se puede observar, sutilmente, que a medida que se añaden cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂ sobre la disolución mezcla de ligandos (**1+9**), las resonancias correspondientes a la glico-oligoamida de **β -D-Man (2)** (círculo rojo) (figura 5.35, C-F) se ensanchan, antes que las resonancias de la glico-oligoamida **6-desoxy- β -D-Man (9)** (círculo verde) (figura 5.35, C-F).

El experimento de competición entre **β -D-Man (1)**, (con un EH intramolecular), y **β -D-Tal (2)**, (con dos enlaces de hidrógeno intramoleculares), con poly(dA-dT)₂ no dio lugar a resultados concluyentes debido a un mayor solapamiento entre las señales de las resonancias de uno y otro compuesto.

Por lo tanto, en base a los experimentos de competición entre parejas de glico-oligoamidas con poly(dA-dT)₂ se pudo establecer un orden de afinidades relativas de las glico-oligoamidas por poly(dA-dT)₂:



En conclusión, las glico-oligoamidas con posibles centros dadores de EH cooperativos **$\beta\text{-D-Man (1)}$** y **$\beta\text{-D-Tal (2)}$** mostraron una menor afinidad por el polímero de ADN poly(dA-dT)₂ que las glico-oligoamidas con centros dadores de EH no cooperativos **$\beta\text{-D-Glc (3)}$** y **$\beta\text{-D-Gal (4)}$** respectivamente.

Por otro lado, la unión entre ligandos derivados de manosa está desfavorecida en el caso de glico-oligoamidas con 6-desoxy carbohidratos.

Estos resultados de los experimentos de competición entre parejas de glico-oligoamidas están de acuerdo con los resultados obtenidos mediante el cálculo de las constantes de asociación por ¹H-RMN en el apartado 5.4.

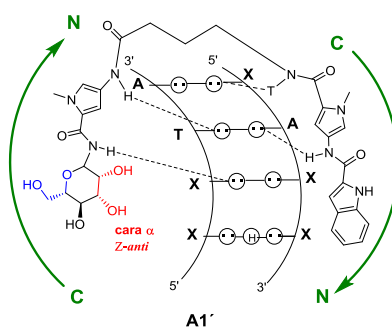
Así, se ha conseguido validar el método de determinación de constantes de asociación anteriormente explicado estableciéndose un orden relativo de afinidades entre los diferentes ligandos del surco menor del ADN estudiados en esta tesis.

Así, la mayor afinidad de la glico-oligoamida **$\beta\text{-L-Man (7)}$** por poly(dA-dT)₂ podría estar relacionada con la orientación del centro dador de EH cooperativo OH-2 hacia el interior del surco menor del ADN en su estado enlazado a poly(dA-dT)₂.

5.5. Conclusiones.

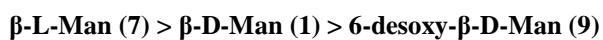
- Los estudios estructurales de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9** en el estado libre en disolución acuosa a 5 °C a través de los experimentos ROESY han mostrado que dichos ligandos tienen una estructura plegada en horquilla.
- En el caso de las glico-oligoamidas **1, 2, 7, 9** cuyo carbohidrato posee el OH-2 en configuración axial se han encontrado nOes que muestran la proximidad de la cara alfa del carbohidrato al indol en el estado libre en disolución acuosa a 5 °C. Además el nOe NH-5/H-2 determina una orientación preferente de los centros C2 y C3 del carbohidrato hacia el arco NH de la glico-oligoamida.
- Los estudios de competición con netropsina han mostrado que las glico-oligoamidas **1, 2 7-9** son ligandos del surco menor del ADN.

- Las valoraciones de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** llevadas a cabo con ct-ADN y poly(dA-dT)₂ han mostrado que dichos ligandos son selectivos de secuencias AT.
- Se ha puesto a punto un experimento DF-STD de competición válido para distinguir entre ligandos efectivos y compuestos que no son ligandos del surco menor del ADN.
- Los experimentos TR-NOESY han confirmado la existencia de la estructura plegada de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** en sus complejos con ct-ADN y poly(dA-dT)₂.
- En el caso de la glico-oligoamida de L-Manosa **7**, en sus complejos con ct-ADN y poly(dA-dT)₂ ha sido posible determinar que la cara α del carbohidrato se enfrenta al indol en la estructura en horquilla.
- Los experimentos DF-STD apuntan a que el centro donador de EH cooperativo OH-2 en **β -L-Man (7)** se orienta más cerca del interior del surco menor del ADN en ambos complejos. Sin embargo, los centros O5, C5 y C6 de **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** son los que se orientan más cerca del interior del surco menor del ADN en el complejo con poly(dA-dT)₂.
- Los resultados de los experimentos TR-NOESY junto con los obtenidos de los DF-STD sugieren que la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** posee una estructura plegada en horquilla con un sentido de plegamiento C \rightarrow N en tanto en el estado enlazado a ct-ADN como a poly(dA-dT)₂.

 β -L-Man (7) vs ADN

- La determinación de las constantes de asociación mediante valoraciones de ¹H-RMN ha permitido el establecimiento de un orden de afinidad relativo de las glico-oligoamidas **1-4**, **7-9** por poly(dA-dT)₂.
- Las competiciones entre parejas de glico-oligoamidas con poly(dA-dT)₂ nos ha permitido la validación del método de determinación de constantes de asociación por ¹H-RMN.

- En la serie de glico-oligoamidas de manosa, las glico-oligoamidas con el carbohidrato de la serie L tiene una mayor afinidad por poly(dA-dT)_2 que las correspondientes glico-oligoamidas derivadas de manosa de la serie D



Así, existe una correlación entre la afinidad de las glico-oligoamidas derivadas de manosa (1, 7 y 9) y la orientación del centro dador de EH cooperativo OH-2. Así, la orientación de dicho centro, en el caso de **$\beta\text{-L-Man (7)}$** , está de acuerdo con una mayor afinidad de dicha glico-oligoamida por el poly(dA-dT)_2 .

5.6. Referencias

- [1] Leefflang, B.; Kroon-Batenburg, L. J. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 495-518.
- [2] (a) Kaerner, A.; Kaerner, D. L.; Rabenstein, A. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *36*, 601-607; (b) Kroon-Batenburg, L. M. J.; Kroon-Batenburg, J.; Kroon, B.; Leefflang, J. F. G.; Vliegthart, L. *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 21-42; (c) Bax, A.; Bax, A. *Roesy Encyclopedia of NMR*, **2012**; Vol. 7; (d) Bax, A.; Morris, G. A.; Emsley, J. W. *ROESY Multidimensional NMR Methods for the Solution State*, **2010**.
- [3] Ragazzon, P.; Ragazzon, N. C.; Garbett, J.; Chaires, P. *Methods* **2007**, *42*, 173-182.
- [4] (a) Neidle, S. *Natural Product Reports* **2001**, *18*, 291-309; (b) Wemmer, D. E.; Dervan, P. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 355-361; (c) Hunziker, J. *Chimia* **1996**, *50*, 248; (d) Kahne, D. *Chem.Biol.* **1995**, *2*, 7-12; (e) Chaires, J. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 314-320.
- [5] (a) Pindur, U.; Jansen, M.; Lemster, T. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 2805-2847; (b) Dervan, P. B.; Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284-299; (c) Dervan, P. B. *Biorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215-2235; (d) Wang, L.; Bailly, C.; Kumar, A.; Ding, D.; Bajic, M.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12-16; (e) Sheng, J.; Gan, Z.; Huang, J.; Sheng *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 1119-1173.
- [6] (a) Loontjens, F.; Loontjens, P.; Regenfuss, A.; Zechel, L.; Dumortier, R.; Clegg, F. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9029-9039; (b) Sirajuddin, M.; Sirajuddin, S.; Ali, A.; Badshah, M.; Sirajuddin *J. Photochem. Photobiol., B* **2013**, *124*, 1-19.
- [7] (a) Eriksson, S.; Kim, M.; Kubista, B.; Norden, S.; Eriksson *Biochemistry* **1993**, *32*, 2987-2998; (b) B, C. h. a. i. r. e. s. J.; Chaires, J. B. *Biopolymers* **1997**, *44*, 201.
- [8] (a) Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257; (b) Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.
- [9] Post, C.; Post *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 581-588.
- [10] (a) Fielding, L.; Fielding *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 219-242; (b) Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151-6170.
- [11] Lepre, C.; Lepre, J. M.; Moore, J.; Peng, C. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641-3676.
- [12] Pellicchia, M.; Pellicchia, D. S.; Sem, K.; Wüthrich, M. *Nature reviews. Drug discovery* **2002**, *1*, 211-219.
- [13] Matsuo, H.; Matsuo, K. J.; Walters, K.; Teruya, T.; Tanaka, G.; Gassner, S.; Lippard, Y.; Kyogoku, G.; Wagner, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9903-9904.
- [14] (a) Wyss, D. *Current opinion in drug discovery & development* **2002**, *5*, 630; (b) Skinner, A.; Skinner, J. S.; Laurence, A. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4670-4695.
- [15] Roldós, V.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 990-1005.
- [16] Martin, J. N.; Munoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Canada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518-9533.
- [17] Ragazzon, P. A.; Garbett, N. C.; Chaires, J. B. *Methods* **2007**, *42*, 173-182.
- [18] (a) Shortridge, M.; Shortridge, D. S.; Hage, G.; Harbison, R.; Powers, M. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 948-958; (b) Shortridge, M.; Bokemper, J.; Copeland, J.; Stark, R.; Powers, M.; Shortridge *Journal of proteome research* **2011**, *10*, 2538-2545.
- [19] Wilson, W. D.; Keel, R.; Mariam, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6267-6269.
- [20] Cahen, P.; Cahen, M.; Luhmer, C.; Fontaine, C.; Morat, J.; Reisse, K.; Bartik, P.; Cahen *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1059-1069.
- [21] Amodeo, P.; Motta, A.; Picone, D.; Saviano, G.; Tancredi, T.; Temussi, P. A. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1991**, *95*, 201-207.
- [22] Nienhaus, G. U. *Protein-ligand interactions: methods and applications; Humana Press.* **2005**.

- [23] Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336-5337.
- [24] Souard, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, Juan L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435-2442.
- [25] Lane, A. N. K., G.; Ramos, A.; Frenkiel, T. A. *J. Biomol. NMR.* **2001**, *21*, 127-139.
- [26] Di Micco, S.; Bassarello, C.; Bifulco, G.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 230-234.
- [27] Bernd, M.; Thomas, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.
- [28] Angulo, J.; Angulo, P. M.; Nieto, J. *European biophysics journal* **2011**, *40*, 1357-1369.
- [29] Mayer, M.; Mayer, B.; Meyer, M.; Mayer J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117.
- [30] Ghavami, A.; Chen, J. J. w.; Pinto, B. M. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 401.
- [31] Neuhaus, D. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*; New York: Wiley. **2000**.
- [32] Albrand, J. P. B., B.; Feeney, J.; Roberts, G. C. K.; Burgen, A. *J. Biol. Macromol.* **1979**, *1*, 37-41.
- [33] Dr. Rafael del Villar-Guerra, Tesis Doctoral. "Miméticos de factores de transcripción: Herramientas químicas para el estudio de modificaciones post-traduccionales de proteínas nucleares que interaccionan con ADN". Universidad de Valladolid. Julio **2012**.
- [34] Hawkins, C. A.; de Clairac, R. P.; Dominey, R. N.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5235-5243.

6. CONCLUSIONES GENERALES.

6.1. Síntesis.

- ✓ Se han desarrollado dos estrategias de síntesis (Ruta A y Ruta B) que han permitido obtener a escala de 30 mg glico-oligoamidas con carbohidratos de la serie D que contienen posibles centros dadores de EH cooperativos: **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**. También se han obtenido las correspondientes glico-oligoamidas con L-carbohidratos, **β -L-Man (7)**, **β -L-Gal (8)**.
- ✓ Se ha obtenido la amina de talosa (**$(AcO)_4\beta$ -D-Tal-NH₂ (28)**) a una escala de 0.3 gramos.
- ✓ El empleo de la Ruta B ha dado lugar a la obtención del modelo de hebra azúcar **β -D-Tal-Py^B-NHAc (6)** a escala de ~0.3 g.

6.2. Estudios conformacionales de las glico-oligoamidas en el estado libre en disolución acuosa.

- ✓ Todas las glico-oligoamidas estudiadas **1-4** y **7-9** presentan un equilibrio conformacional en disolución acuosa donde existe un porcentaje apreciable de conformación en horquilla. Para esta geometría concreta, se puede definir una conformación arqueada con un arco interior delimitado por los grupos NH y un arco exterior delimitado por los grupos CH₃ presentes en la estructura.
- ✓ Se ha comprobado que las glico-oligoamidas cuyo hidroxilo en C-2 está en configuración axial (**β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)**) tienen una estructura en horquilla mejor definida, en disolución acuosa a -15 °C y 5 °C, que las glico-oligoamidas **β -D-Glc (3)** y **β -D-Gal (4)**. Ambas mostraron parámetros de RMN (nOes y $\Delta\delta/\Delta T$) que indican proximidad de la cara α del carbohidrato al indol y el establecimiento de interacciones CH- π que estabilizan la conformación. En el caso de **β -D-Glc (3)** es la cara β del carbohidrato la más próxima al indol.
- ✓ Los parámetros de RMN a baja temperatura permiten definir una conformación en horquilla con un plegamiento en sentido C-N para **β -D-Man (1)** y **β -D-Tal (2)** y **β -L-Man (7)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** quedando los centros C2 y C3 del carbohidrato hacia el arco NH. Sin embargo la glico-oligoamida **β -D-Glc (3)** con OH-2 ecuatorial adopta un sentido de plegamiento N-C.

- ✓ El estudio conformacional a temperatura ambiente EN 1-4 y 7-9 muestra que existe un equilibrio conformacional con un % de horquilla donde ésta está menos definida en el extremo C-terminal.

6.3. Caracterización de EHs intramoleculares en H₂O.

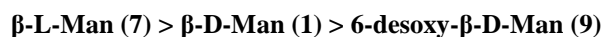
- ✓ Se ha demostrando la existencia de centros dadores de EH cooperativos OH-2 y OH-4 en las glico-oligoamidas **β-D-Man (1)** y **β-D-Tal (2)** respectivamente por formación de las redes de EHs intramoleculares NH-5...OH-2 en **β-D-Man (1)** y NH-5...OH-2...OH-4 en **β-D-Tal (2)** en medio acuoso mediante RMN y cálculos de DM.
- ✓ La comparación de los datos espectroscópicos de **β-D-Man (1)** y **β-D-Tal (2)** con **β-D-Man-Py-NHAc (5)** y **β-D-Tal-Py-NHAc (6)** sugieren que las redes de EH intramoleculares en **5** y **6** no sobreviven en medio acuoso. Este resultado pone de manifiesto la posible influencia entre las interacciones CH- π (carbohidrato-indol) en **1** y **2** y el establecimiento de EHs intramoleculares estables en medio acuoso.

6.4. Estudios de interacción.

- ✓ Se ha determinado que todas las glico-oligoamidas estudiadas son ligandos neutros del surco menor del ADN que presentan una mayor afinidad hacia estructuras de ADN ricas en pares de bases AT.
- ✓ Se ha puesto a punto un experimento DF-STD de competición que ha permitido diferenciar entre ligandos del surco menor de poly(dA-dT)₂ de otros que no lo son. Con dicho experimento se ha confirmado que el fragmento **-Py- γ -Py-Ind** es el fragmento mínimo necesario para que el carbohidrato interaccione con el ADN.
- ✓ Los experimentos TR-NOESY nos han permitido determinar la conformación plegada en disolución acuosa de todas las glico-oligoamidas tanto en sus complejos con ct-ADN como con poly(dA-dT)₂. La glico-oligoamida **β-L-Man (7)** es la que ha presentado una estructura en horquilla mejor definida en ambos complejos siendo la cara α del carbohidrato la que se encuentra más próxima al indol.
- ✓ Los experimentos DF-STD han permitido determinar que el centro dador de EH cooperativo OH-2 en **β-L-Man (7)** se orienta más cerca del interior del surco menor del ADN en ambos complejos. Sin embargo los centros O5, C5 y C6 de **β-D-Man (1)** y **β-D-**

Tal (2) son los que se orientan más cerca del interior del surco menor del ADN en el complejo con poly(dA-dT)₂.

- ✓ Los resultados de los experimentos TR-NOESY junto con los obtenidos de los DF-STD han mostrado que la glico-oligoamida **β-L-Man (7)** posee una estructura plegada en horquilla con un sentido de plegamiento C→N en su estado asociado tanto a ct-ADN como a poly(dA-dT)₂.
- ✓ Se ha establecido un orden relativo de afinidades de las glico-oligoamidas por poly(dA-dT)₂ mediante un protocolo que consta de dos tipos de experimentos diferentes: la determinación de las constantes de afinidad y la realización de experimentos de competición por valoración seguida por ¹H-RMN. Estos estudios nos han permitido concluir que:
 - En la serie de glico-oligoamidas de manosa, las glico-oligoamidas con el carbohidrato de la serie L tiene una mayor afinidad por poly(dA-dT)₂ que las correspondientes glico-oligoamidas derivadas de manosa de la serie D.



- ✓ Los datos estructurales de los complejos con poly(dA-dT)₂ y el orden relativo de afinidades permite concluir que: existe una correlación entre la afinidad de las glico-oligoamidas derivadas de manosa (**1**, **7** y **9**) y la orientación del centro dador de EH cooperativo OH-2. Así, la orientación de dicho centro, más cerca del interior del surco menor del ADN, en el caso de **β-L-Man (7)**, está de acuerdo con una mayor afinidad de dicha glico-oligoamida por el poly(dA-dT)₂.

7. PARTE EXPERIMENTAL: SÍNTESIS DE LAS GLICO-OLIGOAMIDAS.

7.1. Materiales y Métodos.

A. Disolventes y Reactivos

Todas las reacciones con reactivos sensibles se realizaron bajo atmósfera de argón, excepto las indicadas en cada caso. La mayoría de los reactivos y disolventes utilizados provienen de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Sharlab y Acros y cuando fue necesario se purificaron por los procedimientos habituales descritos.^[1]

Se utilizó un sistema de purificación de disolventes *Pure Solv* modelo PS-400-3-MD para el secado de los siguientes disolventes.: THF, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno, éter dietílico y DMF. En algunos casos, se emplearon tamices moleculares para un mejor secado.

La activación de los tamices moleculares pulverizados (4 Å) se realiza mediante ciclos de calentamiento, (a temperaturas elevadas en un microondas doméstico a 700 W, 2-3 min) y, enfriamiento, (utilizando presión reducida durante 20 min en una línea de vacío). Se despresuriza el matraz con atmósfera de argón, este proceso se repite tres veces para asegurar el secado del tamiz molecular.

El procedimiento general empleado para crear la atmósfera de H₂ durante las reacciones de hidrogenación catalítica con Pd sobre carbono activado consistió en: disolver los reactivos correspondientes en el disolvente indicado en cada caso, tras hacer vacío en el matraz de reacción, se conectan dos globos rellenos de H₂. Al conectar los globos al matraz en uno de los globos se utiliza una aguja larga y ancha, de forma que el H₂ pueda borbotear en el seno de la disolución y que la aguja no se obstruya durante el transcurso de la reacción.

El CDCl₃ empleado en RMN fue filtrado a través de Al₂O₃ básica 150 Merck (tipo T, 0.063-0.200 mm) cuando la muestra a analizar era presumiblemente sensible a un ligero medio ácido.

B. Procedimientos Generales

- *Cromatografía en columna*

La purificación de los productos de reacción se realizó por cromatografía en columna bajo presión (cromatografía flash),^[2] utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck (con un tamaño de partícula 230-400 mesh ASTM) y, como fase móvil, disolventes previamente destilados. El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones de la mezcla de disolventes utilizadas son siempre volumen/volumen.

- **Cromatografía en capa fina**

El seguimiento de las reacciones se ha llevado a cabo por cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatofolios de gel de sílice tipo 60F₂₅₄ Merck (230-400 mesh), con soporte de aluminio, de un espesor de capa de 0.2 mm. El análisis de las placas se ha llevado a cabo empleando un visor con una lámpara de UV 254/366 nm y el revelado de las placas se realizó por inmersión de las placas en la disolución de revelador y, posteriormente calentamiento a temperaturas superiores a 100 °C.

Se emplearon diferentes disoluciones de reveladores químicos: disolución de molibdato amónico y sulfato de cerio (IV) en H₂SO₄/H₂O al 5%(v/v), (mostain), disolución de H₂SO₄ (óleum, 97%) al 5% (v/v) en EtOH, disolución de ácido fosfomolíbico al 10% en EtOH, y una disolución de ninhidrina al 5% en EtOH.

- **Resonancia Magnética Nuclear**

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ¹H y carbono ¹³C (completamente desacoplados) se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C), excepto en los que se indican otra temperatura. Los disolventes deuterados se adquirieron en Merck Aldrich o en SDS y se usaron sin purificación adicional. Las disoluciones en disolventes orgánicos de los compuestos se prepararon en un rango de concentraciones entre 1 mg/0.5 ml y 10 mg/0.5 ml, dependiendo de la solubilidad de los compuestos estudiados. El disolvente deuterado se especifica en cada caso (CDCl₃, DMSO, CD₃OD, CO(CD₃), D₂O), empleando los siguientes espectrómetros: *Varian INOVA-300* (¹H a 300 MHz y ¹³C a 75 MHz), *Bruker Avance-300* (¹H a 300 MHz y ¹³C a 75 MHz), *Varian INOVA-400* (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz), *Varian MERCURI-400* (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz), *Varian INOVA-500* (¹H a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz) y *Bruker Avance-500* (¹H a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz).

Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (δ, ppm), y están referenciados utilizando como referencia interna la señal residual de protón del disolvente deuterado utilizado en cada caso: CDCl₃, 7.26 ppm (¹H-RMN) y 77.00 ppm (¹³C-RMN); DMSO 2.50 ppm (¹H-RMN) y 39.43 ppm (¹³C-RMN); CD₃OD, 3.31 ppm (¹H-RMN) y 49.05 ppm (¹³C-RMN); CO(CD₃)₂ 2.05 ppm (¹H-RMN) y 30.83 ppm (¹³C-RMN). Todos los espectros en disolución acuosa se registraron usando presaturación de la señal del agua o bien usando la secuencia de pulsos “*watergate*”. Los desplazamientos químicos en disolución acuosa, D₂O o mezclas H₂O/D₂O (90:10) y H₂O/Acetona-d₆, (90:10), están referidos en

relación a 3-(trimetilsilil)propionato sódico-2,2,3,3- d_4 (TSP- d_4 , $(CH_3)_3SiCD_2CD_2CO_2Na$) como referencia interna ($\delta = 0.00$ ppm).

La diferencia, en Hertzios, entre las líneas de un multiplete son las constantes de acoplamiento (J) y corresponden a los valores de las constantes de acoplamiento aparentes, medidas directamente sobre el espectro registrado. El aspecto y la multiplicidad de las señales de RMN de protones se indican mediante las siguientes abreviaturas: s (singlete), sa (singlete ancho), d (doblete), dd (doblete doblado), ddd (doblete doblado de dobletes), qd (cuadruplete de doblado), t (triplete), q (cuadruplete), y m (multiplete o múltiples señales). Para los singletes anchos se dará el desplazamiento químico del centro de la señal. Para el solapamiento de multipletes simétricos y no simétricos se dará el rango de desplazamientos químicos de las señales. Los protones diastereotópicos de los centros proquirales se nombrarán como H y H', designando con H' al núcleo situado a campo bajo (mayor desplazamiento químico).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón 1H se describen indicando en cada caso el desplazamiento químico, la multiplicidad aparente de cada señal, el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz), el número de protones (deducidos por integración) y la asignación estructural cuando fue posible.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ^{13}C (completamente desacoplados) se describen indicando en cada caso el desplazamiento químico (ppm), el tipo de carbono: CH_3 (primario), CH_2 (secundario), CH (terciario), C (cuaternario), CO (carbonílico) y la asignación estructural cuando fue posible. La asignación de las señales de ^{13}C se ha deducido de experimentos de correlación heteronuclear $^1H/^{13}C$ HSQC-editado y HMBC.

La asignación de los distintos protones y carbonos se hizo en base a experimentos bidimensionales utilizando la secuencia de pulsos estándar para cada uno de ellos. Los siguientes acrónimos serán empleados para nombrar estos experimentos de RMN: COSY (*Correlated Spectroscopy*), DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) y TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*).

- **Puntos de Fusión (P.f.)**

Los puntos de fusión (P.f.) se midieron en un microscopio de platina calefactora Kofler marca Reicher Jung Thermovar y no están corregidos.

- **Rotación óptica específica ($[\alpha]^D$)**

Las rotaciones ópticas observadas (α) se midieron a temperatura ambiente en un polarímetro *Perkin-Elmer 241-MC* con una lámpara de Na ($\lambda = 589$ nm, línea D), utilizando una célula de cuarzo de 1 dm de longitud y 1 ml de capacidad. En cada caso se indica el disolvente y la concentración (c en g/100 ml) utilizados. Calculándose la rotación óptica específica por medio de la siguiente fórmula:

$$[\alpha]^D = \frac{100\alpha}{l \cdot c}$$

α = rotación óptica observada
 $l = 1$ dm
 $c = g / 100 mL$

- **Espectroscopía de Infrarrojo**

Los espectros de infrarrojo (**IR**) se registraron en un espectrofotómetro *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum One*, y las frecuencias (ν) de los máximos de las bandas más significativas se indican en cm^{-1} . Los espectros de productos sólidos se registraron en pastillas de KBr seco y las muestras líquidas en película (film) entre cristales de NaCl.

- **Espectrometría de Masas**

Los espectros de masas de baja resolución (**MS**) se registraron en un espectrómetro *Hewlett Packard LCMS 1100 MSD* (analizador cuadrupolar acoplado a un HPLC) por inyección directa de la muestra por medio de la técnica de *electrospray* en sus modos positivo (**ESI+**) o negativo (**ESI-**), aplicando un voltaje capilar de 4000 V, una temperatura de secado de 330 °C y usando como portador una mezcla (1:1) $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ con 1% AcOH . La espectrometría de masas de alta resolución (**HRMS**) se realizó en un equipo Agilent 6520 Accurate Mass QTOF LC/MS mediante la técnica de electrospray en su modo positivo (**ESI+**) o negativo (**ESI-**). Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/z). La determinación de la masa exacta y la fórmula molecular del compuesto se obtiene tras la aplicación de un algoritmo de deconvolución (*“Find By Molecular Feature”*, Agilent Technologies) al espectro obtenido.

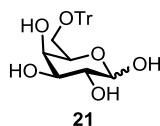
- **Análisis Elemental**

Los análisis elementales se efectuaron en el Departamento de Análisis Instrumental del Instituto de Química Orgánica General (C.S.I.C.) con los analizadores *Perkin-Elmer 240C* y *Heraeus CHN-O-Rapid*. Los datos calculados y observados se expresan en tantos por ciento.

7.2. Preparación de las glico-oligoamidas β -D-Tal (2), β -L-Man (7) y β -L-Gal (8).

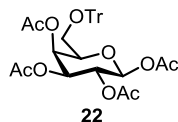
7.2.1. Preparación de los equivalentes sintéticos de las aminas anoméricas II.

7.2.1.1. Preparación de 6-O-tritil-D-Galactosa^[3] (21)



A una suspensión de **D-Galactosa (20)** (10.0 g, 55.5 mmol) en piridina seca (122 ml) se añade cloruro de trifenilmetano (23.3 g, 83.3 mmol). La mezcla de reacción se agita a 60 °C durante toda la noche. A continuación se elimina el disolvente a presión reducida coevaporando con tolueno. El residuo resultante se disuelve en CH_2Cl_2 y se lava con agua. La fase orgánica se seca con sulfato sódico, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida hasta sequedad. El residuo se purifica mediante columna cromatográfica de gel de sílice. Las impurezas se eluyen con CH_2Cl_2 y el producto deseado **6-O-tritil-D-Galactosa (21)** se obtiene usando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Trietilamina}$ (90:10:1, v/v/v). El compuesto **21** ($R_f = 0.42$) resultó ser una mezcla compleja de confórmers y anómeros en CDCl_3 . Dicho compuesto se aisló con un rendimiento del 75%. (17.4 g). La mezcla de **21** tiene un espectro de masas (m/z 422.2) y unas señales de RMN acordes a la presencia del grupo tritilo ($\delta = 7.13\text{--}7.41$ ppm). Para su completa caracterización se acetila una porción del compuesto **6-O-tritil-D-Galactosa (21)** como se indica a continuación.

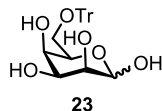
Preparación de (AcO)₄-6-O-tritil- β -D-Gal^[3] (22)



Sobre una disolución de **6-O-tritil-D-Galactosa (21)**,^a (0.2 g, 0.48 mmol), en piridina, (6 ml), se añade anhídrido acético (4 ml). Se agita la mezcla de reacción durante toda la noche a temperatura ambiente y a continuación se elimina la piridina coevaporando con tolueno a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente Hexano/AcOEt, (2:1, v/v) para proporcionar el compuesto como único anómero β (**(AcO)₄-6-O-tritil- β -D-Gal (22)**) con un rendimiento del 54%, (150 mg). $R_f = 0.11$ Hexano/AcOEt (2:1). $[\alpha]_D^{20} = -19.5$ ($c = 1.0$, CHCl_3).^[4] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.82$

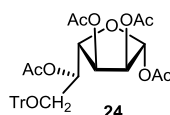
(s, 3H, AcO), 1.93 (s, 3H, AcO), 1.96 (s, 3H, AcO), 2.00 (s, 3H, AcO), 3.00 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-6), 3.34 (dd, $J = 8.8, 5.3$ Hz, 1H, H-6'), 3.87 – 3.92 (m, 1H, H-5), 5.06 (dd, $J = 10.4, 3.4$ Hz, 1H, H-3), 5.19 (dd, $J = 10.4, 8.3$ Hz, 1H, H-2), 5.58 – 5.59 (m, 1H, H-4), 5.61 (s, 1H, H-1), 7.13 – 7.41 (m, 15H, Trt). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.69$ (CH_3 , AcO), 20.79 (CH_3 , AcO), 20.83 (CH_3 , AcO), 20.94 (CH_3 , AcO), 60.35 (CH_2 , C-6), 67.02 (CH , C-4), 68.26 (CH , C-2), 71.21 (CH , C-3), 73.02 (CH , C-5), 92.34 (CH , C-1), 127.32 (CH , Trt), 128.06 (CH , Trt), 128.75 (CH , Trt), 143.30 (C, Trt), 169.16 (CO, AcO), 169.55 (CO, AcO), 169.88 (CO, AcO), 170.18 (CO, AcO). HRMS (ESI+): Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{NaO}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 613.2044, encontrado 613.2019; Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{KO}_{10}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ 629.1784, encontrado 629.1755; Análisis elemental calculado (%) para $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$: C, 67.11; H, 5.80. Hallado: C, 67.16; H, 5.84.

7.2.1.2. Preparación de 6-*O*-tritol-D-Talosa^[5] (**23**)



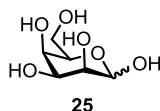
Una mezcla de **6-*O*-tritol-D-Galactosa (**21**)** (2.0 g, 4.7 mmol) y Bu_2SnO (1.30 g, 5.2 mmol) en benceno se calienta a reflujo mediante un sistema Dean-Stark para la eliminación azeotrópica de agua durante 2.5 h. Después de concentración, el residuo se disuelve en una mezcla DMF/ H_2O (15:1). La mezcla de reacción se agita a 50 °C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo el crudo se concentra coevaporando con tolueno a presión reducida y se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ /Trietilamina (20/1/0.1, v/v/v). Se aísla el compuesto **6-*O*-tritol-D-Talosa (**23**)**, (cuyo $R_f = 0.5$ en una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ /Trietilamina (90/10/1, v/v/v)), como una mezcla compleja de anómeros y confómeros cuya proporción no pudo determinarse por RMN. Dicha mezcla se obtuvo con un rendimiento del 54% (1.1 g). El compuesto **23** posee un espectro de masas (m/z 422.2) y unas señales de RMN acordes a la presencia del grupo tritilo ($\delta = 7.20$ -7.41 ppm). Para su caracterización se acetila una porción de la mezcla **6-*O*-tritol-D-Talosa (**23**)** como se indica a continuación.

Preparación de (AcO)₄-6-*O*-tritol- α -D-Talofuranosa^[6] (24)



La mezcla de **6-*O*-tritol-D-Talosa (23)** (0.18 g, 0.40 mmol) se trata con NaOAc (0.033 g, 0.4 mmol) y Ac₂O (2 ml, mmol) y se agita a temperatura ambiente durante toda la noche y después a 100 °C durante 2 h. A continuación se elimina el disolvente coevaporando con tolueno a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente Hexano/Acetona, (4:1, v/v) para proporcionar el compuesto deseado como un único anómero en su forma furanosa **(AcO)₄-6-*O*-tritol- α -D-Talofuranosa (24)** (160 mg) con un rendimiento del 45%. R_f = 0.22 Hexano/Acetona (4:1). $[\alpha]_D^{25} = +6.2$ (c = 1.0, CHCl₃).^[6] **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):** δ = 1.94 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO), 2.10 (s, 3H, AcO), 2.13 (s, 3H, AcO), 3.25 (dd, J = 10.2, 6.4 Hz, 1H, H-6), 3.31 (dd, J = 10.2, 6.4 Hz, 1H, H-6'), 4.43 (dd, J = 7.2, 5.5 Hz, 1H, H-4), 5.15 (m, 1H, H-5), 5.19 (dd, J = 7.2, 4.9 Hz, 1H, H-3), 5.26 – 5.31 (m, 1H, H-2), 6.09 (sa, 1H, H-1), 7.24 – 7.41 (CH, 15H, Trt). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ = 20.52 (CH₃, AcO), 20.68 (CH₃, AcO), 21.08 (CH₃, AcO), 21.18 (CH₃, AcO), 62.63 (CH₂, C-6), 70.59 (CH, C-3), 71.91 (CH, C-5), 74.25 (CH, C-2), 79.81 (CH, C-4), 97.93 (CH, C-1), 127.31 (CH, Trt), 128.00 (CH, Trt), 128.79 (CH, Trt), 143.69 (C, Trt), 169.07 (CO, AcO), 169.53 (CO, AcO x 2), 170.10 (CO, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para C₃₃H₃₈NaO₁₀ [M+Na]⁺ 613.2044, encontrado 613.2065; Calculado para C₃₃H₃₈NO₁₀ [M+NH₄]⁺ 608.2490, encontrado 608.2504.

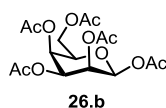
7.2.1.3. Preparación de D-Talosa^[5,7] (25)



Se disuelve la mezcla de isómeros de **6-*O*-tritol-D-Talosa (23)**, (1.0 g, 2.36 mmol), en ácido acético (10.0 ml) y agua (0.83 ml). La reacción se agita a 60 °C durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo se concentra la mezcla de reacción eliminando el disolvente a presión reducida coevaporando con tolueno. El crudo de reacción se purifica mediante columna cromatografía de gel de sílice empleando como eluyente un gradiente de la mezcla CH₂Cl₂/MeOH, (9:1 → 3:1, v/v), obteniéndose el compuesto deseado **D-Talosa (25)**. Dicho compuesto se aísla como

una mezcla compleja de anómeros y confórmers con un rendimiento del 90% (380 mg). La proporción de anómeros y confórmers en D₂O se determina de forma aproximada haciendo uso del espectro de ¹³C y mediante la comparación de los desplazamientos químicos del espectro de carbono con los descritos previamente en la bibliografía.^[8] Así, la proporción aproximada de la mezcla es la siguiente: α-piranosas/β-piranosas/α-furanosas/β-furanosas^a 1/0.8/0.4/0.2. La caracterización de la mezcla de isómeros se describe a continuación. **P.f.**= 92-94°C. **¹³C NMR (D₂O):** (α-piranosas) = 62.4, 66.0, 70.62, 71.6, 72.2, 95.6. (β-piranosas) = 62.2, 69.4, 69.6, 72.5, 76.6, 95.1. (α-furanosas) = 63.7, 71.6, 72.8, 76.13, 82.8, 101.9. (β-furanosas) = 63.8, 71.5, 71.7, 71.9, 83.4, 97.5. **E. M (ES +) m/z:** 181 [M+H]⁺; 203 [M+Na]⁺, encontrado 203.0507.

7.2.1.4. Preparación de (AcO)₅-β-D-Tal (26.b)

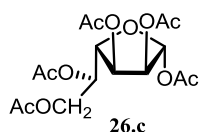


Sobre una disolución de la mezcla de **D-Talosa (25)**^a (1.14 g, 6.3 mmol) en piridina (12 ml) se añade anhídrido acético^[7] (7.0 ml). La mezcla de reacción se agita durante 5 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se elimina la piridina coevaporando con tolueno a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente éter dietílico/pentano (1.5:1, v/v) para obtener **(AcO)₅-D-Talosa** como mezcla de anómeros y confórmers α-piranosas/β-piranosas/α-furanosas (**26.a/26.b/26.c**) en una proporción (1/0.4/0.6). (2.16 g, R = 88%). Dicha proporción fue calculada mediante la integración de las señales de los protones anoméricos correspondientes en el espectro de ¹H-RMN (H-1_{α-piranosas} = 6.16, H-1_{β-piranosas} = 5.84, H-1_{α-furanosas} = 6.10 ppm). Se aisló una cantidad analítica de los anómeros β-piranosas y α-furanosas para su completa caracterización.

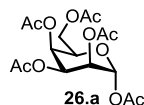
Caracterización de (AcO)₅-β-D-Tal^[9] (26.b): R_f = 0.10 Éter/Pentano (1.5:1). [α]^D = -5.2 (c = 0.86, CHCl₃). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 2.01 (s, 3H, AcO-3), 2.05 (s, 3H, AcO-6), 2.12 (s, 3H, AcO-1), 2.14 (s, 3H, AcO-4), 2.19 (s, 3H, AcO-2), 4.06 (dt, J = 6.59, 1.53 Hz, 1H,

^a El compuesto **D-Talosa 25** ha sido caracterizado anteriormente por Pfeffer et al. mediante la asignación de las resonancias de ¹³C, como una mezcla compleja de confórmers y anómeros α-piranosas/β-piranosas/α-furanosas/β-furanosas en una proporción 4/3/2/1 en D₂O.^[8] Los desplazamientos químicos de ¹³C coinciden con los descritos en bibliografía.

H-5), 4.23 (ddd, $J = 23.14, 11.34, 6.62$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 5.14 (t, $J = 3.64, 3.64$ Hz, 1H, H-3), 5.32 (d, $J = 2.62$ Hz, 1H, H-4), 5.39 (d, $J = 2.59$ Hz, 1H, H-2), 5.84 (d, $J = 1.47$ Hz, 1H, H-1). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):** $\delta = 20.47$ (CH_3 , AcO), 20.59 (CH_3 , AcO), 20.66 (CH_3 , AcO), 20.71 (CH_3 , AcO), 20.78 (CH_3 , AcO), 61.26 (CH_2 , C-6), 64.62 (CH , C-4), 66.47 (CH , C-2), 67.54 (CH , C-3), 72.41 (CH , C-5), 90.72 (CH , C-1), 168.31 (CO, AcO), 169.41 (CO, AcO), 170.02 (CO4, AcO), 170.15 (CO, AcO), 170.40 (CO, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_{11}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 408.1500, encontrado 408.1486. **IR (film):** $\nu = 3636, 3476, 3024, 2965, 2438, 1748, 1645, 1433, 1371, 1226, 1180, 1153, 1120, 1094, 1053, 696, 948, 929, 755, 667, 646, 625, 600$ cm^{-1} . **Análisis elemental calculado (%)** para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9$: C, 49.23; H, 5.68. Hallado: C, 49.09; H, 5.66.



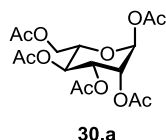
Caracterización de $(\text{AcO})_5\text{-}\alpha\text{-D-Talofuranosa}^{[10]}$ (26.c). $R_f = 0.21$ Dietil éter/Pentano (1.5:1). $[\alpha]^D = +34.8$ ($c = 1.2$, CHCl_3). [lit.:^[10] $[\alpha]^D = +38.6$ ($c = 0.5$, CHCl_3)]; **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):** $\delta = 2.03$ (s, 6H, AcO x 2), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.09 (s, 3H, AcO), 2.10 (s, 3H, AcO), 4.14 (dd, $J = 11.9, 6.6$ Hz, 1H, H-6), 4.26 (dd, $J = 11.9, 4.5$ Hz, 1H, H-6'), 4.33 (td, $J = 4.6, 2.0$ Hz, 1H, H-4), 5.17 (dt, $J = 6.6, 4.5$ Hz, 1H, H-5), 5.28 - 5.31 (m, 2H, H-2, H-3), 6.10 (s, 1H, H-1). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):** δ ppm 20.47 (CH_3 , AcO), 20.59 (CH_3 , AcO), 20.76 (CH_3 , AcO), 20.84 (CH_3 , AcO), 21.08 (CH_3 , AcO), 62.42 (CH_2 , C-6), 69.74 (CH , C-5), 70.04 (CH , C-2), 73.99 (CH , C-3), 79.31 (CH , C-4), 97.75 (CH , C-1), 168.95 (CO1, AcO), 169.47 (CO3, AcO), 169.59 (CO2, AcO), 169.99 (CO5, AcO), 170.53 (CO6, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_{11}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 408.1500, encontrado 408.11509. **IR (film):** $\nu = 2961, 1749, 1434, 1372, 1220, 1046, 967, 896$ cm^{-1} . **Análisis elemental calculado (%)** para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C, 49.23; H, 5.68. Hallado: C, 48.94; H, 5.75.



Caracterización de $(\text{AcO})_5\text{-}\alpha\text{-D-Tal}$ (26.a) [lit.:^[11] $[\alpha]^D = +34.6$ ($c = 1.0$, CHCl_3)]; [lit.:^[7] $[\alpha]^D = +32.5$ ($c = 0.1$, CHCl_3)]; [lit.:^[12] $[\alpha]^D = +52.5$ ($c = 0.1$, CHCl_3)]; [lit.:^[10] $[\alpha]^D = +74.8$ ($c = 0.5$,

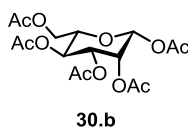
CHCl_3). $R_f = 0.19$ Éter dietílico/Pentano (1.5:1). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.01$ (s, 3H, AcO x 2), 2.05 (s, 3H, AcO), 2.15 (s, 3H, AcO), 2.16 (s, 6H, AcO x 2), 4.14 (dd, $J = 3.6$, 6.7 Hz, 2H, H-6, H-6'), 4.32 (m, 1H, H-5), 5.10 (ddd, $J = 1.1$, 1.7, 3.8 Hz, 1H, H-2), 5.32 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-3), 5.35 - 5.37 (m, 1H, H-4), 6.16 (d, 1H, H-1). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ ppm 20.7, 20.9, 21.0, 61.5, 65.2, 65.3, 66.4, 68.8, 91.5, 168.2, 169.8, 170.5.

7.2.1.5. Preparación de (AcO)₅- α -L-Man (**30.a**)



Sobre una disolución de **L-manosa**^[13] (**29**), (1.0 g, 5.55 mmol), en piridina, (15 ml), se añade anhídrido acético (10.0 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Transcurrido ese tiempo se elimina la piridina coevaporando con tolueno a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente Hexano/acetato (1:1, v/v). Se obtiene el compuesto deseado (AcO)₅-**L-Manosa** como una mezcla de anómeros **30.a/30.b** α -piranosa/ β -piranosa (1/0.16). Dicha proporción fue calculada mediante la integración de las señales de los protones anoméricos correspondientes en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ ($\text{H-1}_{\alpha\text{-piranosa}} = 6.08$, $\text{H-1}_{\beta\text{-piranosa}} = 5.85$ ppm) (1.87 g, $R = 86\%$). Se aisló una cantidad analítica del anómero α -piranosa para su completa caracterización.

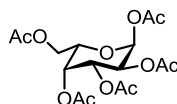
Caracterización de (AcO)₅- α -L-Man (30.a**):** $R_f = 0.27$ Eter dietílico/Pentano (3:2). $[\alpha]^D = -54.3$ ($c = 2.6$, CHCl_3); [lit.:^[14] $[\alpha]^D = -54.9$ ($c = 1.1$, CHCl_3)]. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.00$ (s, 3H, AcO), 2.04 (s, 3H, AcO), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.16 (s, 3H, AcO), 2.17 (s, 3H, AcO), 4.02-4.06 (m, H-5), 4.0 (dd, $J = 12.4$, 2.5 Hz, H-6), 4.27 (dd, $J = 12.4$, 4.9 Hz, 1H, H-6'), 5.25 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2), 5.33-5.35 (m, 2H, H-3, H-4), 6.08 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1). $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.76$ (CH_3 , AcO), 20.78 (CH_3 , AcO), 20.84 (CH_3 , AcO), 20.89 (CH_3 , AcO), 20.99 (CH_3 , AcO), 62.2 (CH_2 , C-6), 65.6 (CH , C-4), 68.4 (CH , C-2), 68.8 (CH , C-3), 70.7 (CH , C-5), 90.7 (CH , C-1), 168.2 (CO, AcO), 169.6 (CO, AcO), 169.8 (CO, AcO), 170.1 (CO, AcO), 170.7 (CO, AcO). **HRMS (ESI+)**: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_{11}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 408.1500, encontrado 408.1499. **IR (film)** $\nu = 2962$, 1752, 1370, 1220, 1149, 1088, 1053, 1026, 974, 755 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado (%) para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C, 49.23; H, 5.68. Hallado: C, 49.51; H, 5.84.



30.b

Caracterización de (AcO)₅-β-L-Man (30.b):^[14] $R_f = 0.20$ Eter dietílico/Pentano (3:2). [lit.:^[14] $[\alpha]^D = +23.3$ ($c = 1.1$, CHCl₃)]. **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):** $\delta = 2.01$ (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO), 2.10 (s, 3H, AcO), 2.11 (s, 3H, AcO), 2.22 (s, 3H, AcO), 3.80 (ddd, $J = 9.9, 5.3, 2.4$ Hz, H-5), 4.16 (d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 4.31 – 4.33 (m, 1H, H-6'), 5.13 (dd, $J = 10.0, 3.2$, 1H, H-3), 5.29 – 5.32 (m, 1H, H-4), 5.49 (dd, $J = 3.2, 1.0$ Hz, 1H, H-2), 5.85 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-1). **¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃)**^[14]: $\delta = 20.5, 20.7, 20.8, 62.1, 65.4, 68.2, 70.6, 73.2, 90.4, 168.4, 169.4, 169.8, 170.2, 170.6$.

7.2.1.6. Preparación de (AcO)₅-α-L-Gal (34.a)



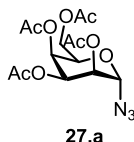
34.a

Sobre una disolución de **L-Galactosa (33)** (0.8 g, 4.4 mmol) en piridina (5 ml) se añade anhídrido acético (3.0 ml). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo se elimina la piridina coevaporando con tolueno a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente Hexano/AcOEt (3:1, v/v). Se obtiene el compuesto deseado como una mezcla de anómeros y confómeros α-piranosas/β-piranosas/α-furanosas/β-furanosas, (**34.a/34.b/34.c/34.d**) en una proporción (1/1/0.2/0.2). (1.68 g, $R = 97\%$). Dicha proporción fue calculada mediante la integración de las señales de los protones anoméricos correspondientes en el espectro de ¹H-RMN ($H-1_{\alpha\text{-piranosa}} = 6.38$, $H-1_{\beta\text{-piranosa}} = 5.72$, $H-1_{\alpha\text{-furanosa}} = 6.32$, $H-1_{\beta\text{-furanosa}} = 6.18$ ppm). Se aisló una cantidad analítica del anómero α-piranosas para su caracterización.

Caracterización de (AcO)₅-α-L-Gal^[14] (**34.a**) $R_f = 0.11$ Hexano/AcOEt (3:1). **P.f.** = 102-104°C. $[\alpha]^D = -100.6$ ($c = 1.0$, CHCl₃). **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):** $\delta = 2.16$ (s, 6H, AcO x 2), 2.04 (s, 3H, AcO), 2.02 (s, 3H, AcO), 2.00 (s, 3H, AcO), 4.06-4.14 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.34 (t, $J = 6.7$ Hz, H-5), 5.34 (s, 2H, H-2, H-3), 5.49 (s, 1H, H-4), 6.37 (s, 1H, H-1). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** $\delta = 20.44$ (CH₃, AcO), 20.61 (CH₃, AcO), 20.64 (CH₃, AcO), 20.66 (CH₃, AcO), 20.88 (CH₃, AcO), 61.24 (CH₂, C-6), 66.43 (CH, C-6), 67.35 (CH, C-4), 67.40 (CH, C-

2), 68.75 (CH, C-5), 89.71 (CH, C-1), 168.90 (CO, AcO), 169.86 (CO, AcO), 170.12 (CO, AcO x 2), 170.35 (CO, AcO). **HRMS (ESI⁺)**: Calculado para $C_{16}H_{26}NO_{11}$ $[M+NH_4]^+$ 408.1500, encontrado 408.1494. **IR (KBr)** ν = 3476 (ancha), 2987, 2853, 1756, 1640, 1436, 1373, 1227, 1170, 1134, 1074, 1050, 1012, 942, 899, 749, 688, 588, 468. cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado (%) para $C_{16}H_{22}O_{11}$: C, 49.23; H, 5.68. Hallado: C, 49.50; H, 5.72.

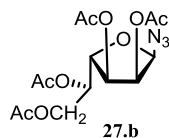
7.2.1.7. Preparación de (AcO)₄- α -D-Tal-N₃ (27.a)



A una disolución de una mezcla de anómeros y de confórmers de (AcO)₅-D-Talosa (26), α -piranosa/ β -piranosa/ α -furanosa, (26.a/26.b/26.c) (0.62 g, 1.6 mmol) en una proporción 1/0.4/0.6 y trimetilsililazida (0.32 ml, 2.4 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (12 ml) en atmósfera de argón, se añade $SnCl_4$ (0.18 ml, 1.6 mmol). La mezcla de reacción agita a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, se lava sucesivamente con agua y con una disolución de $NaHCO_3$ y se extrae la fase orgánica. Se seca con Mg_2SO_4 y se elimina el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente una mezcla hexano/acetato, 3:1, (v/v) obteniéndose la glicosilazida como una mezcla de isómeros α -piranosa/ β -furanosa (1/0.6) (470 mg, R = 80%). Dicha proporción fue calculada mediante la integración de las señales de los protones anoméricos correspondientes en el espectro de 1H -RMN ($H-1_{\alpha\text{-piranosa}}$ = 5.46, $H-1_{\beta\text{-furanosa}}$ = 5.35 ppm). Se aisló una cantidad analítica del anómero α -piranosa para su caracterización.

Caracterización de (AcO)₄- α -D-Tal-N₃ (27.a): R_f = 0.51 Hexano/AcOEt (3:1). $[\alpha]^D = +114.4$ (c = 1.8, $CHCl_3$). **1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ = 1.99 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO), 2.13 (s, 3H, AcO), 2.14 (s, 3H, AcO), 4.16 - 4.26 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.39 (tdd, J = 6.0, 2.0, 0.6 Hz, 1H, H-5), 4.96 (ddd, J = 3.8, 1.8, 0.9 Hz, 1H, H-2), 5.20 (t, J = 3.7 Hz, 1H, H-3), 5.32 - 5.34 (m, 1H, H-4), 5.46 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-1). **^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)** δ = 20.69 (CH_3 , AcO), 20.77 (CH_3 , AcO), 20.82 (CH_3 , AcO), 20.99 (CH_3 , AcO), 61.91 (CH_2 , C-6), 64.94 (CH, C-3), 65.69 (CH, C-4), 67.23 (CH, C-2), 69.16 (CH, C-5), 88.17 (CH, C-1), 169.57 (CO, AcO), 169.99 (CO, AcO), 170.16 (CO, AcO), 170.64 (CO, AcO). **HRMS (ESI⁺)**: Calculado para $C_{14}H_{23}N_4O_9$ $[M+NH_4]^+$ 391.1460, encontrado 391.1474. **IR (KBr)**: ν = 3473, 2123, 1751, 1643, 1436, 1373, 1231, 1123, 1087, 1047, 1028, 952, 896, 796, 731, 626, 601, 565, 477 cm^{-1} .

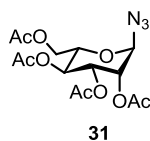
Análisis elemental calculado (%) para $C_{14}H_{29}N_3O_9$: C, 45.04; H, 5.13; N, 11.26. Hallado: C, 44.90; H, 5.20; N, 11.40.



También fue posible identificar **27.b** aunque no totalmente puro.

Caracterización de (AcO)₄-β-D-Tal-furanosa-N₃ (27.b): $R_f = 0.54$ Hexano/AcOEt (3:1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** $\delta = 2.05$ (s, 3H, AcO), 2.07 (s, 3H, AcO), 2.11 (s, 3H, AcO), 2.16 (s, 3H, AcO), 4.20 - 4.24 (m, 1H, H-6), 4.35 - 4.40 (m, 2H, H-4, H-6'), 5.11 (dd, $J = 4.7, 1.7$ Hz, 1H, H-2), 5.22 (dd, $J = 5.1, 2.8$ Hz, 1H, H-5), 5.25 (dd, $J = 7.3, 4.7$ Hz, 1H, H-3), 5.35 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-1). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)** $\delta = 20.55$ (CH₃, AcO), 20.68 (CH₃, AcO), 20.78 (CH₃, AcO), 20.86 (CH₃, AcO), 65.27 (CH₂, C-6), 68.04 (CH, C-5), 70.09 (CH, C-3), 74.25 (CH, C-2), 79.71 (CH, C-4), 92.36 (CH, C-1), 168.51 (2xCO, 2xAcO), 170.17 (CO, AcO), 170.62 (CO, AcO).

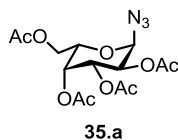
7.2.1.8. Preparación de (AcO)₄-α-L-Man-N₃ (31).



Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que (AcO)₄-α-D-Tal-N₃ (27.a) a partir de una disolución de la mezcla de anómeros de (AcO)₅-α/β-L-Man (30.a/30.b), (2.15 g, 5.5 mmol). Se purifica el producto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de Éter dietílico/pentano, 2:3, v/v) obteniéndose como único anómero (AcO)₄-α-L-Man-N₃ (31). (1.44 g, $R = 70\%$). $R_f = 0.23$ Éter dietílico/Pentano (2:3). $[\alpha]_D^{20} = -120.9$ ($c = 3.9$, CHCl₃). **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)** $\delta = 1.99$ (s, 3H, AcO-), 2.05 (s, 3H, AcO-), 2.11 (s, 3H, AcO), 2.16 (s, 3H, AcO), 4.12-4.17 (m, 1H, H-5), 4.18 (d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 4.30 (dd, $J = 12.5, 5.6$ Hz, 1H, H-6'), 5.15 (dd, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H, H-2), 5.23 - 5.31 (m, 2H, H-3, H-4), 5.38 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)** $\delta = 20.75$ (CH₃, AcO), 20.81 (CH₃, AcO), 20.85 (CH₃, AcO), 20.96 (CH₃, AcO), 62.28 (CH₂, C-6), 65.76 (CH, C-4), 68.37 (CH, C-3), 69.32 (CH, C-2), 70.77 (CH, C-5), 87.60 (CH, C-1), 169.76 (CO, AcO), 169.87 (CO, AcO), 169.99 (CO, AcO), 170.72 (CO, AcO). **HRMS (ESI⁺):** Calculado para

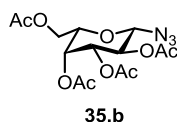
$C_{14}H_{23}N_4O_9$ $[M+NH_4]^+$ 391.1460 encontrado 391.1457. **IR (film):** ν = 3637, 3438, 3390, 2960, 2464, 2122, 1748, 1434, 1371, 1223, 1125, 1085, 1053, 960 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado (%) para $C_{14}H_{29}N_3O_9$: C, 45.04; H, 5.13; N, 11.26. Hallado: C, 45.14; H, 5.30; N, 11.17.

7.2.1.9. Preparación de (AcO) $_4$ - α -L-Gal-N $_3$ (35.a).



Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que (AcO) $_4$ - α -D-Tal-N $_3$ (27.a) a partir de una disolución de la mezcla de anómeros de (AcO) $_4$ -L-Gal (34), α -piranosa/ β -piranosa/ α -furanosa/ β -furanosa, **34.a/43.b/34.c/34.d** (1.48 g, 3.79 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 h. Se obtiene el compuesto (AcO) $_4$ - α -L-Gal-N $_3$ como una mezcla de anómeros y confórmers α -piranosa/ β -piranosa/ β -furanosa, **35.a/35.b/35.c**, en una proporción 1/0.15/0.15. (1.13 g, R = 80%). Dicha proporción fue calculada mediante la integración de las señales de los protones anoméricos correspondientes en el espectro de 1H -RMN ($H-1_{\alpha\text{-piranosa}}$ = 5.66, $H-1_{\beta\text{-piranosa}}$ = 4.59 ppm, $H-1_{\beta\text{-furanosa}}$ = 5.44 ppm). Se aislaron cantidades analíticas de los anómeros α y β en su forma piranosa, **35.a** y **35.b**, para su caracterización.

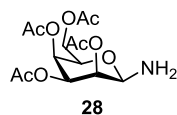
Caracterización de (AcO) $_4$ - α -L-Gal-N $_3$ (35.a): R_f = 0.25 Hexano/AcOEt (2.5:1). **P.f.** = 65-67 °C. $[\alpha]^D = -189.2$ (c = 0.97, $CHCl_3$). **1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$):** δ = 1.99 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO), 2.11 (s, 3H, AcO), 2.15 (s, 3H, AcO), 4.08-4.15 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.35-4.37 (m, 1H, H-5'), 5.20 (dd, J = 10.8, 4.0 Hz, 1H, H-2), 5.25 (dd, J = 10.8, 3.1 Hz, 1H, H-3), 5.46 (dd, J = 3.1, 1.3 Hz, 1H, H-4), 5.66 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H-1). **^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$):** δ = 20.58 (2xCH $_3$, 2xAcO), 20.63 (CH $_3$, AcO), 20.66 (CH $_3$, AcO), 61.47 (CH $_2$, C-6), 67.19 (CH, C-3), 67.35 (CH, C-2), 67.60 (CH, C-4), 68.54 (CH, C-5), 86.72 (CH, C-1), 169.79 (CO, AcO), 170.17 (CO, AcO), 170.31 (CO, AcO), 170.55 (CO, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para $C_{14}H_{23}N_4O_9$ $[M+NH_4]^+$ 391.1460, encontrado 391.1459. **IR (KBr):** ν = 3477, 2980, 2122, 1750, 1638, 1467, 1374, 1255, 1237, 1222, 1123, 1091, 1068, 1012, 949, 928, 904, 871, 749, 675, 625, 566, 499 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado (%) para $C_{14}H_{19}N_3O_9$: C, 45.04; H, 5.13; N, 11.26. Hallado: C, 44.11; H, 5.23; N, 11.40.



Caracterización de (AcO)₄-β-L-Gal-N₃ (35.b): R_f = 0.40 Hexano/AcOEt (2.5:1). **P.f.** = 81-83°C. $[\alpha]_D^{20}$ = +21.9 (c = 1.6, CHCl₃). **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):** δ = 1.99 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO), 2.09 (s, 3H, AcO), 2.17 (s, 3H, AcO), 4.01 (td, J = 6.6, 1.2 Hz, 1H, H-5), 4.16 (dd, J = 6.5, 5.5 Hz, 2H, H-6, H-6'), 4.59 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-1), 5.03 (dd, J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, H-3), 5.16 (dd, J = 10.4, 8.7 Hz, 1H, H-2), 5.42 (dd, J = 3.4, 1.1 Hz, 1H, H-4). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ = 20.67 (CH₃, AcO), 20.77 (CH₃, AcO), 20.81 (CH₃, AcO), 20.83 (CH₃, AcO), 61.37 (CH₂, C-6), 66.99 (CH, C-4), 68.20 (CH, C-2), 68.42 (CH, C-3), 70.87 (CH, C-5), 88.45 (CH, C-1), 169.51 (CO, AcO), 170.13 (CO, AcO), 170.25 (CO, AcO), 170.51 (CO, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para C₁₄H₂₃N₄O₉ [M+NH₄]⁺ 391.1460, encontrado 391.145. **IR (KBr):** ν = 3475 (ancha), 2985, 2165, 2126, 1748, 1640, 1436, 1373, 1227, 1170, 1134, 1074, 1050, 1012, 942, 899, 882, 749, 688, 626, 589, 524, 468 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado (%) para C₁₄H₁₉N₃O₉: C, 45.04; H, 5.13; N, 11.26. Hallado: C, 44.97; H, 5.08; N, 11.23.

7.2.2. Preparación de las aminas anoméricas.

7.2.2.1. Preparación de (AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28)

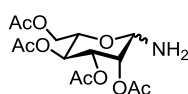


Una disolución de una mezcla de isómeros de (AcO)₄-D-Talosa-N₃ (27) α-piranosas/β-furanosas, **27.a/27.b** (0.3 g, 0.8 mmol) y Pd/C (5%) (0.15 g) en CH₂Cl₂ anhidro (15 ml) se hidrogena a presión atmosférica y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Nylon para eliminar el Pd/C y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose la amina de forma mayoritaria^b en su forma β-piranosas (AcO)₄-β-D-Tal-NH₂ (28) (0.25 g, R = 92%). R_f = 0.10 Hexano/Acetato (1:1). **¹H**

^b En el espectro de ¹H-RMN del compuesto **28** se observa la presencia, aunque muy minoritaria, de posibles confórmers y anómeros el derivado de talosamina que no se pudieron identificar. En la purificación de **28** mediante columna cromatográfica en gel de sílice no se consigue mayor grado de pureza. Por lo tanto, la glicosilamina **28** se empleó directamente en la reacción de acoplamiento sin purificación por columna cromatográfica.

NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.98 (s, 3H, AcO), 2.05 (s, 3H, AcO), 2.13 (s, 3H, AcO), 2.17 (s, 3H, AcO), 3.89 (td, J = 6.6, 1.5 Hz, 1H, H-5), 4.11 – 4.22 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.39 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-1), 5.08 (t, J = 3.8 Hz, 1H, H-3), 5.25 (ddd, J = 3.9, 1.5, 0.9 Hz, 1H, H-4), 5.31 (ddd, J = 3.8, 1.5, 0.9 Hz, 1H, H-2). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ = 20.69 (CH₃, AcO), 20.83 (CH₃, AcO), 20.89 (CH₃, AcO x 2), 62.11 (CH, C-6), 65.12 (CH, C-4), 68.80 (CH, C-3), 69.98 (CH, C-2), 72.33 (CH, C-5), 82.71 (CH, C-1), 169.70 (CO, AcO), 170.21 (CO, AcO), 170.25 (CO, AcO), 170.65 (CO, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para **C₁₄H₂₂O₉N** [M+NH]⁺ 348.1289, encontrado 348.1299; Calculado para **C₁₄H₂₁O₉NNa** [M+Na]⁺ 370.1109, encontrado 370.1114; Calculado para **C₁₄H₂₅N₂O₉** [M+NH₄]⁺ 365.1555, encontrado 365.11562. **IR (KBr):** ν = 1755, 1732, 1378, 1244, 1226, 1038 cm⁻¹.

7.2.2.2. Preparación de (AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂ (**32.a/32.b**)



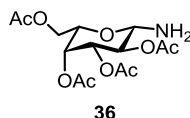
32.a/32.b

Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que (AcO)₄- α -D-Tal-NH₂ (**28**) a partir de (AcO)₄- α -L-Man-N₃ (**31**), (0.5 g, 1.34 mmol) para obtener el compuesto (AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂, **32.a/32.b**,^c como una mezcla de anómeros de piranosa α/β en una proporción 0.15/1. (0.44 g, R = 95%). Dicha proporción fue calculada mediante la integración de las señales de los protones anoméricos correspondientes en el espectro de ¹H-RMN (H-1 _{α -piranosa} = 4.90, H-1 _{β -piranosa} = 4.47 ppm). R_f = 0.13 Hexano/AcOEt (2:1). [α]^D = +9.4 (c = 1.0, CHCl₃).^[15] **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):** δ = 1.98 (s, 3H, AcO, anómero β), 2.02 (s, 3H, AcO, anómero α), 2.04 (s, 3H, AcO, anómero β), 2.06 (s, 3H, AcO, anómero α), 2.10 (s, 6H, AcO x 2, anómeros α y β), 2.15 (s, 3H, AcO, anómero α), 2.20 (s, 3H, AcO, anómero β), 3.67 (ddd, J = 9.9, 5.6, 2.4 Hz, 1H, H-5, anómero β), 4.02-4.06 (m, 1H, H-6, anómero α), 4.11 (dd, J = 12.2, 2.3 Hz, 1H, H-6, anómero β), 4.25 (dd, J = 12.2, 5.6 Hz, 1H, H-6', anómero β), 4.29-4.35 (m, 2H, H-5, H-6', anómero α), 4.47 (s, 1H, H-1, anómero β), 4.90 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-1, anómero α), 5.07 (dd, J = 10.1, 3.4 Hz, 1H, H-3, anómero β), 5.19 (t, J = 10.0 Hz, 1H, H-4, anómero β), 5.21-5.26 (m, 2H, H-2, H-4, anómero α), 5.34 (dd, J = 9.2, 3.4 Hz, 1H, H-3, anómero α), 5.41 (dd, J =

^c En la purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice el compuesto no se obtuvo con mayor grado de pureza ni se consiguió aislar un único anómero puro para su caracterización. Por lo tanto, la mezcla de anómeros **32.a/32.b** se empleó directamente en la reacción de acoplamiento sin purificación por columna cromatográfica

3.4, 1.1 Hz, 1H, H-2, anómero β). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):** (anómero β) δ = 20.76 (CH_3 , AcO), 20.88 (CH_3 , AcO), 20.94 (CH_3 , AcO), 20.99 (CH_3 , AcO), 62.99 (CH_2 , C-6), 65.98 (CH , C-4), 70.83 (CH , C-2), 72.15 (CH , C-3), 73.45 (CH , C-5), 82.37 (CH , C-1), 169.87 (CO, AcO4), 170.21 (CO, AcO3), 170.38 (CO, AcO2), 170.87 (CO, AcO6). (Anómero α) δ = 20.84 (CH_3 , AcO), 20.92 (CH_3 , AcO), 20.97 (CH_3 , AcO), 21.10 (CH_3 , AcO), 62.67 (CH_2 , C-6), 66.91 (CH , C-4), 68.44 (CH , C-5), 69.16 (CH , C-3), 70.15 (CH , C-2), 81.15 (CH , C-1), 169.79 (CO, AcO), 170.14 (CO, AcO), 170.72 (CO, AcO), 170.98 (CO, AcO). **E. M (ES+) m/z:** 348 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 370 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 695 $[2\text{M}+\text{H}]^+$. **IR (film):** ν = 3412, 2927, 1748, 1636, 1432, 1368, 1280, 1219, 1120, 1063, 1041, 961 cm^{-1} .

7.2.2.3. Preparación de $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-NH}_2$ (**36**)

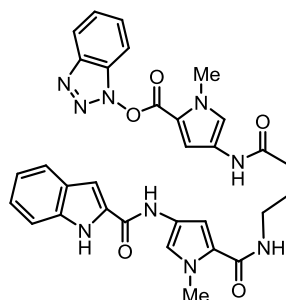


Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que $(\text{AcO})_4\text{-}\alpha\text{-D-Tal-NH}_2$ (**28**) a partir de una disolución de $(\text{AcO})_4\text{-}\alpha/\beta\text{-L-Gal-N}_3$, **35.a/35.b** (0.26 g, 0.69 mmol) para obtener el compuesto deseado en forma de un solo anómero $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-NH}_2^{\text{d}}$ (**36**) (0.23 g, R = 95%). **R_f** = 0.1 Hexano/AcOEt (2:1). **P.f.** = 99-101 °C. **$[\alpha]^{\text{D}}$** = -31.5 (c = 1.2, CHCl_3). **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):** δ = 1.99 (s, 3H, AcO), 2.05 (s, 3H, AcO), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.15 (s, 3H, AcO), 3.90 (td, J = 6.6, 1.2 Hz, 1H, H-5), 4.10 (dd, J = 6.6, 1.2 Hz, 2H, H-6, H-6'), 4.16 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-1), 5.01-5.07 (m, 2H, H-2, H-3), 5.40 (dd, J = 3.0, 1.2 Hz, 1H, H-4). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):** δ = 20.77 (CH_3 , AcO), 20.84 (CH_3 , AcO), 20.90 (CH_3 , AcO), 21.08 (CH_3 , AcO), 61.96 (CH_2 , C-6), 67.74 (CH , C-4), 69.90 (CH , C-3), 71.44 (CH , C-3), 71.60 (CH , C-5), 88.45 (CH , C-1), 170.25 (CO, AcO), 170.38 (CO, AcO), 170.62 (2xCO, AcO), 170.64 (2xCO, AcO). **HRMS (ESI+):** Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.1289, encontrado 348.1284. **IR (KBr):** ν = 3393, 1743, 1725, 1634, 1432, 1373, 1240, 1149, 1103, 1076, 1059, 1028, 966, 900, 876, 799, 736, 712, 600, 576, 542, 520, 493, cm^{-1} . **Análisis elemental calculado (%)** para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9$: C, 48.41; H, 6.09; N, 4.03. Hallado: C, 48.09; H, 6.12; N, 4.15.

^d No fue necesaria la purificación de **36** mediante columna cromatográfica. Se empleó **36** directamente en la reacción de acoplamiento con el ácido activado **HO-Py- γ -Py-Ind** (**18**).

7.2.3. Preparación de los derivados acetilados de las glico-oligoamidas β -L-Man (7) y β -L-Gal (8) por la Ruta A.

7.2.3.1. Preparación de BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (19)^[16]



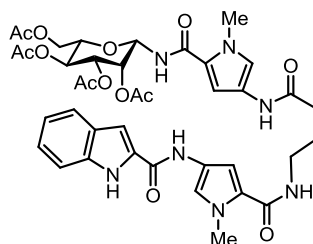
19

A una disolución de **HO-Py^B- γ -Py^A-Ind (18)** (681 mg, 1.387 mmol), 1-hidroxi-*1H*-benzotriazol (HOBt, 375 mg, 2.774 mmol) y hexafluorofosfato de tetrametilfluoroamidinio, (TFFH), (806 mg, 3.053 mmol) en DMF anhidra (9.6 ml) se le añade DIEA (960 μ l, 5.511 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez de finalizada la reacción, monitorizada por cromatografía en capa fina (Acetona/hexano, 2:1, v/v), se elimina el disolvente a presión reducida primero en el rotavapor y luego en el liofilizador, obteniéndose un residuo que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt), obteniéndose el producto deseado **BtO-Py^B- γ -Py^A-Ind (19)**, (780 mg, R = 92%), como un sólido amarillo. R_f = 0.20 AcOEt; 0.42 Acetona/Hexano (2:1). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 1.84 (m, 2H, γ -b), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, γ -c), 3.21-3.29 (m, 2H, γ -a), 3.85 (s, 3H, Me^A), 3.87 (s, 3H, Me^B), 6.91 (d, J = 1.7 Hz, 1H, Py-3^A), 7.05 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ind-5), 7.19 (t, J = 7.6 Hz, 1H, Ind-6), 7.27-7.31 (m, 3H, Py-5^A, Py-3^B, Ind-3), 7.46 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ind-7), 7.53 (t, J = 7.6 Hz, 1H, BtO), 7.62-7.68 (m, 2H, BtO, Ind-4), 7.75 (d, J = 1.7 Hz, 1H, Py-5^B), 7.83 (d, J = 8.3 Hz, 1H, BtO), 8.10-8.18 (m, 2H, BtO, NH-3), 10.14 (s, 1H, NH-4), 10.30 (s, 1H, NH-2), 11.61 (s, 1H, NH-1). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 25.4 (CH₂, γ -b), 33.2 (CH₂, γ -c), 36.0 (CH₃, Me^A), 36.3 (CH₃, Me^B), 38.1 (CH₂, γ -a), 102.7 (CH, Ind-3), 104.0 (CH, Py-3^A), 109.3 (CH, BtO), 110.3 (CH, Py-3^B), 112.2 (1 \times CH, Ind-7 y 1 \times C, Py^B), 118.0 (CH, Py-5^A), 119.7 y 119.8 (2 \times CH, Ind-5, BtO), 121.5 y 121.6 (CH, Ind-4 y C, Py^A), 123.1 (C, Py^A), 123.3 (CH, Ind-6), 124.2 (C, Py^B), 125.1 y 125.2 (2 \times CH, Py-5^B, BtO), 127.1 (C, Ind-3a), 128.6 (C, BtO), 129.1 (CH, BtO), 131.6 (C, Ind-2), 136.5 (C, Ind-7a), 142.7 (C, BtO), 156.0 (CO), 158.1 (CO), 161.2 (CO), 169.7 (CO). **HRMS (ESI+)** Calculado para C₆₂H₅₈N₁₈O₁₀Na

$[2M+Na]^+$ 1237.4481, encontrado 1237.4506; $C_{62}H_{59}N_{18}O_{10}N$ $[2M+H]^+$ 1215.4662, encontrado 1215.4705; $C_{31}H_{30}N_9O_5$ $[M+H]^+$ 608.2370, encontrado 608.2386. **IR (KBr):** ν = 3354, 3105, 2926, 2856, 2477, 2353, 1764, 1649, 1577, 1523, 1496, 1461, 1408, 1190, 1153, 1101, 1001, 982, 742 cm^{-1} .

7.2.3.2. Preparación de los derivados acetilados (AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (38) y (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (39) por la Ruta A.

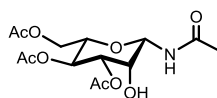
7.2.3.2.1. Preparación de (AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (38) por la Ruta A.



38

A una disolución de **BtO-Py^B-γ-Py^A-Ind (19)**, (250 mg, 0.41 mmol), y **(AcO)₄-α/β-L-Man-NH₂ (32.a/32.b)** (0.15/1) (284 mg, 0.82 mmol), en DMF anhidra bajo atmósfera de argón se añade DIEA (285 μ l, 1.6 mmol). La reacción se agita 92 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se elimina el disolvente a presión reducida coevaporando con tolueno. El compuesto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice en AcOEt/MeOH (20:1). Se obtiene el compuesto **(AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (38)**. (94 mg, R = 28%). En la purificación por columna cromatográfica se eluye primero el producto no deseado **(AcO)₃-β-L-Man-NHAc (40)** obtenido con un rendimiento del 42% y a continuación el producto deseado **38**.

Caracterización de (AcO)₃-β-L-Man-NHAc (40)



40

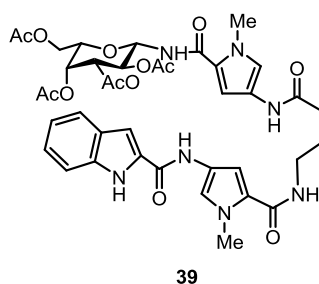
R_f = 0.50 AcOEt/MeOH (20:1). **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):** δ = 1.88 (s, 3H, AcO), 1.98 (s, 3H, AcO), 1.99 (s, 3H, AcO), 2.00 (s, 3H, AcO-), 2.15 (s, 3H, AcO), 3.79-3.82 (m, 1H, H-2),

3.92 (dd, $J = 12.3, 2.3$ Hz, 1H, H-6), 4.08 (dd, $J = 12.2, 4.9$ Hz, 1H, H-6'), 4.97 (dd, $J = 10.1, 3.1$ Hz, 1H, H-3), 5.14 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4), 5.34 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-1), 5.66 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, OH), 8.35 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, NH). **^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3):** $\delta = 20.55$ (CH_3 , AcO), 20.56 (CH_3 , AcO), 20.77 (CH_3 , AcO), 22.55 (CH_3 , AcO), 62.31 (CH_2 , C-6), 65.41 (CH , C-4), 67.71 (CH , C-2), 72.38 (CH , C-5), 73.06 (CH , C-3), 77.23 (CH , C-1), 169.25 (CO, AcO), 169.58 (CO, AcO), 169.83 (CO, AcO), 170.06 (CO, AcO).

Caracterización de $(\text{AcO})_4\beta\text{-L-Man-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$ (38**).**

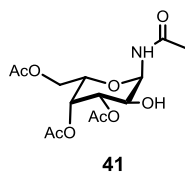
$R_f = 0.45$ AcOEt/MeOH (20:1). **P.f.** = 138-140°C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +7.9$ ($c = 0.9$, MeOH). **^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6):** $\delta = 1.76\text{-}1.79$ (m, 2H, $\gamma\text{-b}$), 1.92 (s, 3H, AcO), 2.00 (s, 3H, AcO), 2.03 (s, 3H, AcO), 2.17 (s, 3H, AcO), 2.27 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\gamma\text{-c}$), 3.20–3.22 (m, 2H, $\gamma\text{-a}$), 3.77 (s, 3H, Me^{A}), 3.84 (s, 3H, Me^{B}), 3.99 (dd, $J = 12.2, 2.3$ Hz, 1H, H-6), 4.02–4.05 (m, 1H, H-5), 4.18 (dd, $J = 12.2, 5.0$ Hz, 1H, H-6'), 5.07 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 5.24 (dd, $J = 3.6, 1.3$ Hz, 1H, H-2), 5.35 (dd, $J = 10.2, 3.5$ Hz, 1H, H-3), 5.81 (dd, $J = 8.9, 1.4$ Hz, 1H, H-1), 6.77 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^{B}), 6.89 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^{A}), 7.05 (ddd, $J = 8.0, 6.9, 1.0$ Hz, 1H, Ind-5), 7.19 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, 1H, Ind-6), 7.26–7.28 (m, 3H, Ind-3, Py-5^{A} , Py-5^{B}), 7.46 (d, $J = 8.2, 2.8$ Hz, 1H, Ind-7), 7.64 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, Ind-4), 8.09 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH-3), 8.55 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH-5), 9.82 (s, 1H, NH-4), 10.28 (s, 1H, NH-2), 11.59 (d, $J = 2.2$ Hz, NH-1). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6):** $\delta = 20.4$ (CH_3 , AcO), 20.5 (CH_3 , AcO), 20.6 (CH_3 , AcO), 21.0 (CH_3 , AcO), 25.7 (CH_2 , $\gamma\text{-b}$), 33.2 (CH_2 , $\gamma\text{-c}$), 36.1 (CH_3 , Me^{A}), 36.2 (CH_3 , Me^{B}), 38.2 (CH_2 , $\gamma\text{-a}$), 62.3 (CH , C-6), 65.4 (CH , C-4), 68.4 (CH , C-2), 70.9 (CH , C-3), 72.9 (CH , C-5), 77.2 (CH , C-1), 102.8 (CH , Ind-3), 104.1 (CH , Py-3^{A}), 105.4 (CH , Py-3^{B}), 112.3 (CH , Ind-7), 118.1 (CH , Py-5^{A}), 119.2 (CH , Py-5^{B}), 119.8 (CH , Ind-5), 121.3 (C, Py^{B}), 121.5 (CH , Ind-4), 121.6 (C, Py^{A}), 121.9 (C, Py^{B}), 123.2 (C, Py^{A}), 123.4 (CH , Ind-6), 127.1 (C, Ind-3a), 131.7 (C, Ind-2), 136.6 (C, Ind-7a), 158.2 (CO-1), 160.4 (CO-4), 161.2 (CO-2), 169.3 (CO-3), 169.5 (CO, AcO), 169.6 (CO, AcO), 170.0 (CO, AcO), 170.4 (CO, AcO). **HRMS (ESI+)** Calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_{13}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 820.3148, encontrado 820.3181. **IR (KBr):** $\nu = 3421$ (ancha), 2135, 1749, 1649, 1592, 1526, 1438, 1403, 1369, 1306, 1242, 1146, 1054, 813, 748, 672, 599 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado % para $\text{C}_{39}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_9$: C, 57.14; H, 5.53; N, 11.96. Hallado: C, 57.02; H, 5.63; N, 12.13

7.2.3.2.2. Preparación de (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (39)^e por la Ruta A.



El compuesto **39** fue sintetizado por el mismo procedimiento que el compuesto (AcO)₄-β-L-Man-Py^B-γ-Py^A-Ind (**38**) a partir de BtO-Py-γ-Py-Ind (**19**), (150 mg, 0.25 mmol), y de (AcO)₄-β-L-Gal-NH₂ (**36**) (174 mg, 0.50 mmol). Se obtiene el compuesto deseado (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**39**), (142 mg, R = 70%). En la purificación por columna cromatográfica se eluye primero el producto no deseado (AcO)₃-β-L-Gal-NHAc (**41**) obtenido con un rendimiento del 15% y a continuación el producto deseado **38**.

Caracterización de (AcO)₃-β-L-Gal-NHAc (**41**)



$R_f = 0.50$ AcOEt/MeOH (20:1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.91 (s, 3H, AcO), 1.95 (s, 3H, AcO), 1.97 (s, 3H, AcO), 2.08 (s, 3H, AcO-), 2.15 (s, 3H, AcO), 3.87-4.07 (m, 4H, H-2, H-6, H-6', H-5), 5.15-5.26 (m, 2H, H-3, H-4), 5.40 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, OH), 5.54 (dd, $J = 9.3, 5.6$ Hz, 1H, H-1), 8.61 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 20.41 (CH₃, AcO), 20.49 (CH₃, AcO), 20.62 (CH₃, AcO), 22.81 (CH₃, AcO), 61.40 (CH₂, C-6), 63.73 (CH, C-2), 66.50 (CH, C-5), 67.58 (CH, C-4), 70.05 (CH, C-3), 76.35 (CH, C-1), 169.88 (CO, AcO), 170.07 (2xCO, 2xAcO), 170.39 (CO, AcO).

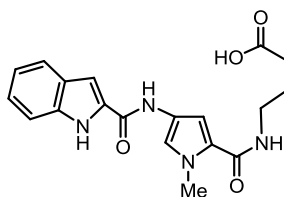
Caracterización de (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (39)

^e En este apartado se incluye la caracterización del compuesto no deseado (AcO)₃-β-L-Gal-NHAc (**41**) obtenido en la reacción de acoplamiento entre BtO-Py-γ-Py-Ind (**19**) y (AcO)₄-β-L-Gal-NH₂ (**33**).

$R_f = 0.45$ AcOEt/MeOH (20:1). **P.f.** = 160-165 °C. $[\alpha]_D^{25} = +16.5$ ($c = 0.8$, MeOH). **^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):** $\delta = 1.76$ -1.82 (m, 2H, γ -b), 1.91 (s, 3H, AcO), 1.92 (s, 3H, AcO), 1.99 (s, 3H, AcO), 2.12 (s, 3H, AcO), 2.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, γ -c), 3.22 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, γ -a), 3.78 (s, 3H, Me^A), 3.84 (s, 3H, Me^B), 3.96-4.06 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.32 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H-5), 5.20-5.26 (m, 1H, H-2), 5.27-5.31 (m, 2H, H-3, H-4), 5.45 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-1), 6.78 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Py-3^A), 7.05 (ddd, $J = 8.0, 6.9, 1.0$ Hz, 1H, Ind-5), 7.19 (ddd, $J = 8.2, 6.9, 1.2$ Hz, 1H, Ind-6), 7.24 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, P-5^B), 7.28 (m, 2H, Ind-3, Py-5^A), 7.46 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H, Ind-7), 7.65 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H, Ind-4), 8.10 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-3), 8.77 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH-5), 9.85 (s, 1H, NH-4), 10.29 (s, 1H, NH-2), 11.60 (d, $J = 2.2$ Hz, NH-1). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):** $\delta = 20.4$ (CH₃, AcO-), 20.5 (CH₃, AcO-), 20.5 (CH₃, AcO-), 20.6 (CH₃, AcO-), 25.7 (CH₂, γ -b), 33.2 (CH₂, γ -c), 36.1 (CH₃, Me^A), 36.2 (CH₃, Me^B), 38.2 (CH₂, γ -a), 61.4 (CH, C-6), 67.6 (CH, C-4), 68.3 (CH, C-2), 71.2 (CH, C-3), 71.3 (CH, C-5), 77.5 (CH, C-1), 102.8 (CH, Ind-3), 104.1 (CH, Py-3^A), 104.9 (C, Py-3^B), 112.3 (CH, Ind-7), 118.1 (CH, Py-5^A), 119.2 (CH, Py-5^B), 119.8 (CH, Ind-5), 121.4 (C, Py-2^B), 121.5 (CH, Ind-4), 121.6 (C, Py-4^A), 122.1 (C, Py-4^B), 123.2 (C, Py-2^A), 123.4 (CH, Ind-6), 127.1 (C, Ind-3a), 131.7 (C, Ind-2), 136.6 (C, Ind-7a), 158.2 (CO-1), 160.9 (CO-4), 161.2 (CO-2), 169.1 (CO, AcO), 169.3 (CO), 169.4 (CO, AcO), 169.9 (CO, AcO), 169.9 (CO, AcO). **HRMS (ESI+)** Calculado para C₃₉H₄₅N₇O₁₃ [M+H]⁺ 820.3148, encontrado 820.3152. **IR (KBr):** $\nu = 3412$ (ancha), 2936, 1749, 1654, 1579, 1531, 1465, 1439, 1403, 1370, 1307, 1231, 1146, 1084, 1053, 956, 910, 851, 748, 602, 559 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado % para C₃₉H₃₇N₇O₉: C, 57.14; H, 5.53; N, 11.96. Hallado: C, 57.08; H, 5.72; N, 11.66

7.2.4. Preparación de las glico-oligoamidas β -D-Tal (**2**), β -L-Man (**7**) y β -L-Gal (**8**) por la Ruta B.

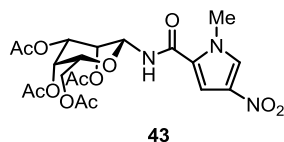
7.2.4.1. Preparación de HO- γ -Py^A-Ind^[17] (**15**).



A una disolución de **EtO- γ -Py-Ind (14)**, (9.0 g, 0.023 mol), en THF, (120 mL), se añade LiOH·H₂O, (6.3 g, 0.154 mol), disuelto en una mezcla THF/H₂O (70 mL/70 mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se neutraliza con HCl (1M) y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna en AcOEt, (para eliminar la DIPU), y posteriormente en AcOEt/metanol (4:1) para eluir el ácido de la columna que se queda retenido, obteniéndose **HO- γ -Py-Ind (15)** (8.0 g, R = 95%) como un sólido blanco. **P.f.** = 196-199 °C. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ = 1.70-1.74 (m, 2H, γ -b), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H, γ -c), 3.19 (dd, J = 12.6, 6.6 Hz, 2H, γ -a), 3.83 (s, 3H, MeN-), 6.90 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Py-3), 7.04 (ddd, J = 7.9, 7.1, 0.8 Hz, 1H, Ind-5), 7.19 (ddd, J = 8.1, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ind-6), 7.30 (m, 2H, Ind-3, Py-5), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ind-7), 7.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ind-4), 8.20 (t, J = 5.0 Hz, 1H, NH-3), 10.42 (s, 1H, NH-2), 11.74 (s, 1H, NH-1). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: δ = 24.9 (CH₂, γ -b), 32.0 (CH₂, γ -c), 36.0 (CH₃, MeN-), 38.1 (CH₂, γ -a), 102.9 (CH, Ind-3), 104.0 (CH, Py-3), 112.2 (CH, Ind-7), 118.0 (CH, Py-5), 119.7 (CH, Ind-5), 121.4 (CH, Ind-4), 121.6 (C), 123.2 (C), 123.3 (CH, Ind-6), 127.1 (C), 131.7 (C), 136.6 (C), 158.1 (CO), 161.1 (CO), 175.0 (CO). **MS (ESI⁺)**: m/z : 759 [2M + Na]⁺, 391 [M + Na]⁺, 369 [M + H]⁺. **IR (KBr)**: ν = 3137, 2928, 1718, 1511, 1317, 1100, 847 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado (%) para C₁₉H₂₀N₄O₄: C, 61.95; H, 5.47; N, 15.21. Hallado: C, 61.67; H, 5.31; N, 15.40.

7.2.4.2. Preparación de los equivalentes sintéticos del pirrol de la hebra azúcar.

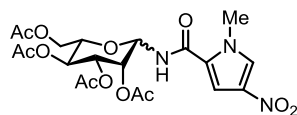
7.2.4.2.1. Preparación de (AcO)₄- β -D-Tal-Py^B-NO₂ (43).



Una disolución de **HO-Py^B-NO₂ (42)**, (140 mg, 0.8 mmol), PyBOP, (415 mg, 0.8 mmol) y DIEA, (380 μ L, 2.16 mmol), en DMF anhidra, (4 mL), se agita 1 h. a temperatura ambiente bajo argón. Transcurrido ese tiempo, a esta disolución, se añade **(AcO)₄- β -D-Tal-NH₂ (28)**, (280 mg, 0.8 mmol). Después de 16 h se evapora el disolvente a presión reducida coevaporando con tolueno. El residuo se purifica por cromatografía en columna en Hexano/AcOEt (4:1) para obtener el compuesto deseado **(AcO)₄- β -D-Tal-Py^B-NO₂ (43)**. (272 mg, R = 68%). **R_f** = 0.43 Hexano/AcOEt (1:1). **P.f.** = 96-98 °C. **[α]^D** = -11.7 (c = 0.9, MeOH). **¹H-RMN (500 MHz,**

DMSO- d_6 : δ = 1.89 (s, 3H, AcO), 2.00 (s, 3H, AcO), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.15 (s, 3H, AcO), 3.89 (s, 3H, Me^B), 4.07-4.09 (m, 2H, H₆, H-6'), 4.26-4.30 (m, 1H, H-5), 5.14-5.16 (m, 1H, H-2), 5.18 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-4), 5.40 (t, J = 3.8 Hz, 1H, H-3), 5.73 (dd, J = 1.03, 8.53 Hz, 1H, H-1), 7.66 (d, J = 1.87 Hz, 1H, Py-3^B), 8.17 (d, J = 1.79 Hz, 1H, Py-5^B), 9.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH-5). **^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6)**: δ = 20.31 (CH₃, AcO-3), 20.41 (CH₃, AcO), 20.53 (CH₃, AcO), 21.03 (CH₃, AcO), 37.63 (CH₃, Me^B), 61.65 (CH₂, C₆), 65.05 (CH, C₄), 67.28 (CH, C₂), 67.77 (CH, C₃), 72.53 (CH, C₅), 77.08 (CH, C₁), 109.36 (CH, Py-3^B), 124.88 (C, C₂-Py), 128.68 (CH, Py-5^B), 133.81 (C, C₄-Py), 159.27 (CONH), 169.89 (CO, AcO), 169.83 (CO, AcO), 169.93 (CO, AcO), 170.34 (CO, AcO). **HRMS (ESI⁺)**: Calculado para C₂₀H₂₆N₃O₁₂ [M+H₄]⁺ 500.1511, encontrado 500.1515. **IR (KBr)**: ν = 3435, 3138, 2962, 2928, 1748, 1673, 1521, 1421, 1370, 1312, 1230, 751, 602 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado (%) para C₂₀H₂₅N₃O₁₂: C, 48.10; H, 5.05. Hallado: C, 48.15; H, 5.21.

7.2.4.2.2. Preparación de (AcO)₄- α/β -L-Man-Py^B-NO₂ (**44.a/44.b**).

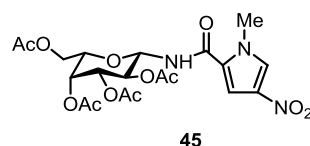


44.a/44.b

Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que el compuesto (AcO)₄- β -D-Tal-Py^B-NO₂ (**43**) a partir de HO-Py^B-NO₂ (**42**) (170 mg, 0.99 mmol) y (AcO)₄- α/β -L-Man-NH₂, (343 mg, 0.99 mmol), en una proporción 0.15/1. Se obtiene el compuesto deseado como una mezcla de anómeros piranosa (AcO)₄- α/β -L-Man-Py^B-NO₂ (**44.a/44.b**) (α/β = 0.15/1). (345 mg, R = 70%). R_f = 0.57 Hexano/AcOEt (1:1). **^1H NMR (500 MHz, CDCl₃)**: δ = 1.93 (s, 3H, AcO, anómero β), 1.98 (s, 3H, AcO, anómero α), 2.00 (s, 3H, AcO, anómero β), 2.03 (s, 3H, AcO, anómero β), 2.04 (s, 3H, AcO, anómero α), 2.13 (s, 3H, AcO, anómero α), 2.19 (s, 3H, AcO, anómero β), 3.89 (s, 3H, Me^B, anómero β), 3.91 (s, 3H, Me^B, anómero α), 3.99 (m, 1H, H-6, anómero β), 4.01-4.15 (m, 3H, H-6, H-5, H-6', anómero α), 4.08 (ddd, J = 10.0, 5.0, 2.3 Hz, 1H, H-5, anómero β), 4.19 (dd, J = 12.4, 5.1 Hz, 1H, H-6', anómero β), 5.09 (t, J = 10.0 Hz, 1H, H-4, anómero β), 5.11-5.15 (m, 2H, H-4, H-2, anómero α), 5.27 (dd, J = 3.5, 1.3 Hz, 1H, H-2, anómero β), 5.38 (dd, J = 10.1, 3.5 Hz, 1H, H-3, anómero β), 5.67 (dd, J = 9.2, 3.7 Hz, 1H, H-1, anómero α), 5.74 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-3, anómero α), 5.85 (dd, J = 8.4, 1.33 Hz, 1H, H-1, anómero β), 7.63 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Py-3^B, anómero β), 7.75 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Py-3^B, anómero α), 8.17 (dd, J = 2.0 Hz, 1H, Py-5^B, anómero β), 8.22 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Py-5^B,

anómero α), 8.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH-5, anómero β), 9.19 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, NH-5, anómero α). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):** (anómero β) $\delta = 20.81$ (CH_3 , AcO), 20.88 (CH_3 , AcO), 20.97 (CH_3 , AcO), 21.47 (CH_3 , AcO), 38.05 (CH_3 , Me^{B}), 62.55 (CH_2 , C-6), 65.72 (CH , C-4), 69.57 (CH , C-2), 71.23 (CH , C-3), 74.15 (CH , C-5), 77.15 (CH , C-1), 109.82 (CH , Py-3^B), 109.82 (CH , Py-3^B), 129.13 (CH , Py-5^B), 159.29 (CO, CONH), 169.95 (CO, AcO), 170.00 (CO, AcO), 170.48 (CO, AcO), 170.78 (CO, AcO). (Anómero α) $\delta = 20.88$ (CH_3 , AcO), 21.02 (CH_3 , AcO), 21.10 (CH_3 , AcO), 21.21 (CH_3 , AcO), 37.90 (CH_3 , Me^{B}), 62.74 (CH_2 , C-6), 65.83 (CH , C-4), 68.59 (CH , C-3), 69.84 (CH , C-2), 72.79 (CH , C-5), 75.65 (CH , C-1), 109.93 (CH , Py-3^B), 128.79 (CH , Py-5^B), 159.75 (CO, CONH), 169.60 (CO, AcO), 169.67 (CO, AcO), 169.85 (CO, AcO), 170.27 (CO, AcO). **E. S. (ES⁺) m/z:** 500 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 522 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1021 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **IR (KBr):** $\nu = 3435, 2963, 1750, 1673, 1521, 1422, 1369, 1312, 1243, 1226, 1105, 1055, 911, 853, 813, 751, 691, 598\text{ cm}^{-1}$.

7.2.4.2.3. Preparación de $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-Py}^{\text{B}}\text{-NO}_2$ (45)

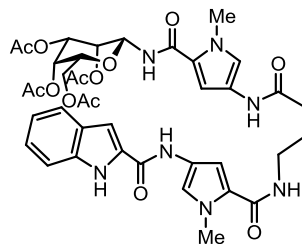


Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que el compuesto $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-D-Tal-Py}^{\text{B}}\text{-NO}_2$ (43) a partir de $\text{HO-Py}^{\text{B}}\text{-NO}_2$ (42) (170 mg, 0.99 mmol) y $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-NH}_2$ (36) (343 mg, 0.99 mmol). El residuo se purifica por cromatografía en columna en Hexano/AcOEt (2:1) para obtener el compuesto deseado $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-Py}^{\text{B}}\text{-NO}_2$ (45) (322 mg, R = 65%). $R_f = 0.68$ Hexano/AcOEt (2/1). **P.f.** = 96-98 °C. $[\alpha]_D^{25} = +1.9$ ($c = 0.9$, MeOH). **^1H -RMN (500 MHz, DMSO-d_6):** $\delta = 1.92$ (s, 6H, AcO x 2), 1.99 (s, 3H, AcO), 2.13 (s, 3H, AcO), 3.90 (s, 3H, Me), 3.97-4.07 (m, 2H, H6, H-6'), 4.36 (td, $J = 6.3, 1.2$ Hz, 1H, H-5), 5.21 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-2), 5.30-5.34 (m, 2H, H-3, H-4), 5.50 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-1), 7.58 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H, Py-3^B), 8.19 (dd, $J = 2.0, 0.7$ Hz, 1H, Py-5^B), 9.23 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH-5). **^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6):** $\delta = 20.40$ (CH_3 , AcO), 20.34 (CH_3 , AcO), 20.49 (CH_3 , AcO), 20.54 (CH_3 , AcO), 37.6 (CH_3 , MeN), 61.4 (CH_2 , C6), 67.55 (CH , C4), 68.25 (CH , C2), 70.99 (CH , C3), 71.43 (CH , C5), 77.30 (CH , C1), 109.04 (CH , Py-3^B), 124.99 (C, C2-Py), 128.76 (CH , Py-5^B), 133.85 (C, C4-Py), 159.85 (CO, CONH), 169.19 (CO, AcO), 169.47 (CO, AcO), 169.89 (2xCO, 2xAcO). **HRMS (ESI⁺):** Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 500.1511, encontrado 500.1519. **IR (KBr):** $\nu = 3428, 3137, 2960, 1678, 1529, 1422, 1370, 1314, 1230, 1169, 1117,$

1084, 1052, 956, 910, 851, 811, 751, 712, 602, 559, 495 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado % para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N}_3$: C, 48.10; H, 5.05; N, 8.41. Hallado: C, 48.30; H, 5.45; N, 8.62.

7.2.4.3. Preparación de los derivados acetilados $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-D-Tal-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$ (**37**), $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Man-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$ (**38**) y $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Gal-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$ (**39**) por la Ruta B.

7.2.4.3.1. Preparación de $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-D-Tal-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$ (**37**) por la Ruta B.



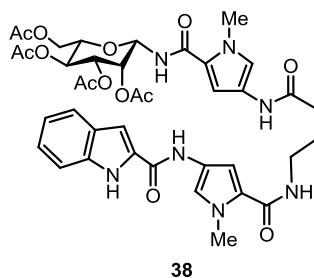
37

Se disuelve **HO- γ -Py^A-Ind** (**15**) (127 mg, 0.35 mmol) y PyBOP (216 mg, 0.41 mmol) en DMF anhidra bajo atmósfera de argón y se agita la reacción a temperatura ambiente durante una noche.

Paralelamente se realiza la reducción del grupo nitro de **β -D-Tal-Py^B-NO₂** (**43**) a amina: una mezcla de **β -D-Tal-Py^B-NO₂** (**43**) (0.173 mg, 0.35 mmol) y Pd/C (5%) (85 mg) en AcOEt/MeOH (1:1) se hidrogena a presión atmosférica y se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Nylon para eliminar el Pd/C y se evapora el disolvente a presión reducida. Sobre el crudo de reacción se añade la disolución del ácido **15** activado con PyBOP. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 48 h. Se elimina el disolvente a presión reducida coevaporando con tolueno. El crudo se disuelve en AcOEt, se lava con agua y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica por cromatografía en columna usando AcOEt (100%) para obtener **$(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-D-Tal-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$** (**37**). (115 mg, R = 40%). R_f = 0.45 AcOEt/MeOH (20:1). **P.f.** = 130-132 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = -52.5 (c = 0.8, MeOH). **¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)** δ = 1.76-1.81 (m, 2H, γ -b), 1.89 (s, 3H, AcO), 2.00 (s, 3H, AcO), 2.07 (s, 3H, AcO), 2.14 (s, 3H, AcO), 2.28 (t, J = 7.5 Hz, 2H, γ -c), 3.19–3.24 (m, 2H, γ -a), 3.77 (s, 3H, Me^A), 3.84 (s, 3H, Me^B), 4.07 (d, J = 6.4 Hz, 2H, H-6, H-6'), 4.24 (t, J = 6.4, 1.5 Hz, 1H, H-5), 5.10–5.13 (m, 1H, H-2), 5.17 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-4), 5.38 (t, J = 3.8 Hz, 1H, H-3), 5.70 (dd, J = 9.2, 1.6 Hz, 1H, H-1),

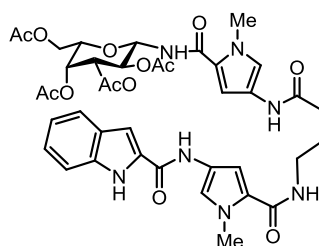
6.78 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^A), 7.03-7.08 (m, 1H, Ind-5), 7.17-7.22 (m, 1H, Ind-6), 7.28 (s, 3H, Ind-3, Py-5^A, Py-5^B), 7.43-7.47 (m, 1H, Ind-7), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ind-4), 8.10 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH-3), 8.55 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH-5), 9.82 (s, 1H, NH-4), 10.28 (s, 1H, NH-2), 11.60 (d, $J = 2.3$ Hz, NH-1). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆)** δ = 20.3 (CH₃, AcO), 20.4 (CH₃, AcO), 20.5 (CH₃, AcO), 21.1 (CH₃, AcO), 25.7 (CH₂, γ -b), 33.2 (CH₂, γ -c), 36.1 (CH₃, Me^A), 36.2 (CH₃, Me^B), 38.2 (CH₂, γ -a), 61.7 (CH, C-6), 65.1 (CH, C-4), 67.6 (CH, C-2), 67.9 (CH, C-3), 72.4 (CH, C-5), 76.8 (CH, C-1), 102.8 (CH, Ind-3), 104.1 (CH, Py-3^A), 105.4 (C, Py-3^B), 112.3 (CH, Ind-7), 118.1 (CH, Py-5^A), 119.3 (CH, Py-5^B), 119.8 (CH, Ind-5), 121.3 (C, Py^B), 121.5 (C, Py^A), 121.5 (CH, Ind-4), 121.9 (C, Py^B), 123.2 (C, Py^A), 123.4 (CH, Ind-6), 127.1 (C, Ind-3a), 131.6 (C, Ind-2), 136.6 (C, Ind-7a), 158.2 (CO), 160.4 (CO-4), 161.2 (CO), 168.9 (CO, AcO), 169.3 (CO-3), 169.8 (CO, AcO), 169.9 (CO, AcO), 170.4 (CO, AcO). **HRMS (ESI+)**: Calculado para C₃₉H₄₅N₇O₁₃ [M+H]⁺ 820.3148, encontrado 820.3124. **IR (KBr)**: ν = 3413 (ancha), 1747, 1649, 1592, 1439, 1397, 1370, 1307, 1235, 1147, 1088, 1049, 913, 851, 745, 602 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado % para C₃₉H₃₇N₇O₉: C, 57.14; H, 5.53; N, 11.96. Hallado: C, 56.90; H, 5.80; N, 11.72.

7.2.4.3.2. Preparación de (AcO)₄- β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (38) por la Ruta B.



Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que (AcO)₄- β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (37) a partir de una mezcla de (AcO)₄- α/β -L-Man-Py^B-NO₂ (44.a/44.b), (0.120 mg, 0.24 mmol). Se obtiene el compuesto deseado (AcO)₄- β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (38). (75 mg, R = 38%). Para ver los datos espectroscópicos de 38, ver apartado 7.2.3.2.1, página 260.

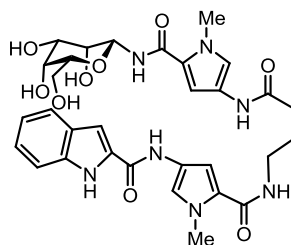
7.2.4.3.3. Preparación de (AcO)₄- β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (39) por la Ruta B.

**39**

Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que (AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**37**) a partir de (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-NO₂ (**45**) (0.150 mg, 0.30 mmol). Se obtiene el compuesto deseado (AcO)₄-β-L-Gal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**39**). (96 mg, R = 39%).^[18] Para ver los datos espectroscópicos de **39**, ver apartado 7.2.3.2.2, página 261.

7.2.4.4. Reacciones de desacetilación.

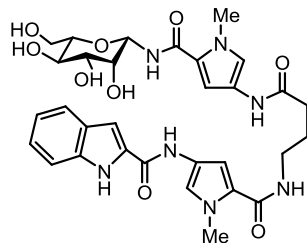
7.2.4.4.1. Preparación de β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**2**).

**2**

A una disolución de (AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**37**) (53 mg, mmol) en metanol se añade una disolución 0.3 M de MeONa en metanol (270 μl, 0.081 mol) obteniéndose un valor aproximado de pH = 9. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se neutraliza utilizando una resina de intercambio Amberlite IR120 (H⁺) hasta pH = 7, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida para obtener el compuesto β-D-Tal-Py^B-γ-Py^A-Ind (**2**). (30 mg, R = 88%). *R_f* = 0.12 CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (6/1/0.1). *P.f.* = 165°C. [*α*]^D = -117.2 (*c* = 1.45, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.74-1.85 (m, 2H, γ-b), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, γ-c), 3.06-3.13 (m, 1H, H-5), 3.22 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, γ-a), 3.34-3.45 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3.64 (ddd, *J* = 5.9, 2.9, 1.5 Hz, 1H, H-2), 3.66-3.70 (m, 1H, H-6), 3.79 (s, 3H, Me^A), 3.84 (s, 3H, Me^B), 4.46 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, OH-6), 4.72-4.74 (m, 2H, OH-3, OH-4), 5.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, OH-2), 5.13 (dd, *J* = 9.2, 1.3 Hz, 1H, H-1), 6.69 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Py-3^A), 7.05 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 1.0 Hz, 1H, Ind-5), 7.16-7.23 (m, 2H, Ind-6,

Py-5^B), 7.28 (m, 2H, Ind-3, Py-5^A), 7.46 (dd, $J = 8.3, 0.9$ Hz, 1H, Ind-7), 7.49 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH-5), 7.65 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, Ind-4), 8.11 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-3), 9.83 (s, 1H, NH-4), 10.29 (s, 1H, NH-2), 11.61 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, NH-1). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆)**: $\delta = 25.63$ (CH₂, γ -b), 33.28 (CH₂, γ -c), 36.07 (CH₃, Me^A), 36.14 (CH₃, Me^B), 38.18 (CH₂, γ -a), 61.21 (CH, C-6), 66.73 (CH, C-3), 70.75 (CH, C-2), 74.01 (CH, C-4), 77.15 (CH, C-1), 78.95 (CH, C-5), 102.82 (CH, Ind-3), 103.87 (CH, Py-3^B), 104.09 (CH, Py-3^A), 112.30 (CH, Ind-7), 118.09 (CH, Py-5^A), 118.75 (CH, Py-5^B), 119.78 (CH, Ind-5), 121.54 (CH, Ind-4), 121.63 (CH, Py-4^A), 121.74 (CH, Py-4^B), 122.26 (CH, Py-2^B), 123.22 (CH, Py-2^A), 123.38 (CH, Ind-6), 127.13 (C, Ind-3a), 131.66 (C, Ind-2), 136.58 (C, Ind-7a), 158.20 (CO1), 159.96 (CO4), 161.20 (CO2), 169.27 (CO3). **HRMS (ESI+)** Calculado para C₃₁H₃₇N₇O₉ [M+H]⁺ 652.2726, encontrado 652.2733. **IR (KBr)**: $\nu = 3410$ (ancha), 1638, 1591, 1518, 1404, 1307, 1252, 1143, 1075, 750, 576 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado % para C₃₁H₃₇N₇O₉: C, 57.14; H, 5.72; N, 15.05. Hallado: C, 57.32; H, 5.88; N, 15.11.

7.2.4.4.2. Preparación de β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (7).

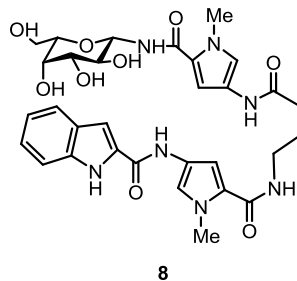


7

Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (2) a partir de (AcO)₄- β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (38) (40 mg, 0.06 mmol). Se obtiene el compuesto β -L-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (7). (22 mg, R = 70%). $R_f = 0.12$ CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (6/1/0.1). **P.f.** = 150-155 °C. $[\alpha]_D^{25} = -10.7$ ($c = 0.8$, MeOH). **¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆)**: $\delta = 1.76$ -1.82 (m, 2H, γ -b), 2.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, γ -c), 3.10 (ddd, $J = 9.3, 6.0, 2.2$ Hz m, 1H, H-5), 3.22 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, γ -a), 3.33-3.45 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3.63-3.66 (m, 1H, H-2), 3.65-3.68 (m, 1H, H-6'), 3.79 (s, 3H, Me^A), 3.84 (s, 3H, Me^B), 4.46 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, OH-6), 4.73 (t, $J = 5.48$ Hz, 2H, OH-3, OH-4), 5.10 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, OH-2), 5.13 (d, $J = 9.3$ Hz, H-1), 6.69 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, $J = 1.9$ Hz, Py-3^A), 7.05 (ddd, $J = 8.0, 6.9, 1.0$ Hz, 1H, Ind-5), 7.17-7.21 (m, 2H, Ind-6, P-5^B), 7.28 (m, 2H, Ind-3, Py-5^A), 7.46 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, Ind-7), 7.49 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH-5), 7.64 (dd, $J = 8.0, 0.9$ Hz, 1H, Ind-4), 8.11 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-3),

9.83 (s, 1H, NH-4), 10.29 (s, 1H, NH-2), 11.61 (d, $J = 2.2$ Hz, NH-1). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6)**: $\delta = 25.6$ (CH_2 , γ -b), 33.3 (CH_2 , γ -c), 36.0 (CH_3 , Me^A), 36.1 (CH_3 , Me^B), 38.22 (CH_2 , γ -a), 61.2 (CH , C-6), 66.6 (CH , C-4), 70.6 (CH , C-2), 73.9 (CH , C-3), 77.1 (CH , C-1), 78.9 (CH , C-5), 102.8 (CH , Ind-3), 103.7 (CH , Py-3^B), 104.0 (CH , Py-3^A), 112.2 (CH , Ind-7), 118.1 (CH , Py-5^A), 118.7 (CH , Py-5^B), 119.8 (CH , Ind-5), 121.5 (CH , Ind-4), 121.5 (C, Py-4^B), 121.6 (C, Py-2^B), 122.2 (C, Py-4^A), 123.1 (C, Py-2^A), 123.3 (CH , Ind-6), 127.0 (C, Ind-3a), 131.6 (C, Ind-2), 136.5 (C, Ind-7a), 158.2 (CO1), 159.9 (CO4), 161.2 (CO2), 169.3 (CO3). **HRMS (ESI+)** Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 651.2726, encontrado 652.2732. **IR (KBr)**: $\nu = 3414$ (ancha), 1643, 1591, 1520, 1465, 1438, 1404, 1341, 1307, 1252, 1207, 1146, 1075, 750, 549 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado % para $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_9$: C, 57.14; H, 5.72; N, 15.05. Hallado: C, 57.45; H, 5.50; N, 15.23.

7.2.4.4.3. Preparación de β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**8**).

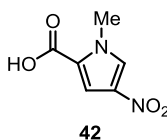


Compuesto sintetizado por el mismo procedimiento que β -D-Tal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**2**) a partir de $(\text{AcO})_4$ - β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**39**) (53 mg, 0.08 mmol). Se obtiene el compuesto β -L-Gal-Py^B- γ -Py^A-Ind (**8**). (26 mg, R = 62%). $R_f = 0.12$ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (6/1/0.1). **P.f.** = 135 °C. $[\alpha]_D^{20} = +24.2$ ($c = 1$, DMSO). **^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6)**: $\delta = 1.76$ -1.82 (m, 2H, γ -b), 2.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, γ -c), 3.20-3.24 (m, 2H, γ -a), 3.32 - 3.41 (m, 2H, H-3, H-5), 3.44 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, H-6), 3.50 (dt, $J = 10.6$, 6.2 Hz, 1H, H-6'), 3.60 (td, $J = 9.2$, 5.6 Hz, 1H, H-2), 3.69-3.72 (m, 1H, H-4), 3.79 (s, 3H, Me^A), 3.84 (s, 3H, Me^B), 4.36 (dd, $J = 4.0$, 0.7 Hz, 1H, OH-4), 4.57 (dd, $J = 6.1$, 5.2 Hz, 1H, OH-6), 4.63 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, OH-2), 4.73 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, OH-3), 4.83 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-1), 6.85 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^A), 7.05 (ddd, $J = 8.0$, 6.9, 1.0 Hz, 1H, Ind-5), 7.17-7.21 (m, 2H, Ind-6, Py-5^B), 7.28-7.29 (m, 2H, Ind-3, Py-5^A), 7.46 (dq, $J = 8.2$, 0.9 Hz, 1H, Ind-7), 7.65 (dq, $J = 8.1$, 0.9 Hz, 1H, Ind-4), 8.11 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-3), 8.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH-5), 9.81 (s, 1H, NH-4), 10.28 (s, 1H, NH-2), 11.60 (d, $J = 2.2$ Hz, NH-1). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6)** δ

= 25.7 (CH₂, γ-b), 33.2 (CH₂, γ-c), 36.1 (CH₃, Me^A), 36.2 (CH₃, Me^B), 38.2 (CH₂, γ-a), 60.5 (CH, C-6), 68.3 (CH, C-4), 69.1 (CH, C-2), 74.4 (CH, C-3), 76.7 (CH, C-5), 80.1 (CH, C-1), 102.8 (CH, Ind-3), 104.1 (CH, Py-3^A), 104.5 (C, Py-3^B), 112.3 (CH, Ind-7), 118.1 (CH, Py-5^A), 118.5 (CH, Py-5^B), 119.8 (CH, Ind-5), 121.5 (CH, Ind-4), 121.6 (C, Py-4^A), 121.9 (C, Py-4^B), 122.2 (C, Py-2^B), 123.2 (C, Py-2^A), 123.3 (CH, Ind-6), 127.1 (C, Ind-3a), 131.7 (C, Ind-2), 136.6 (C, Ind-7a), 158.2 (CO-1), 161.2 (CO-2), 161.2 (CO-4), 169.2 (CO-3). **HRMS (ESI+)** Calculado para C₃₁H₃₈N₇O₉ [M+H]⁺ 652.2726, encontrado 652.2749. **IR (KBr):** ν = 3414 (ancha), 1643, 1591, 1520, 1465, 1438, 1404, 1341, 1307, 1252, 1207, 1146, 1075, 750, 509 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado % para C₃₁H₃₇N₇O₉: C, 57.14; H, 5.72; N, 15.05. Hallado: C, 57.20; H, 5.62; N, 15.22.

7.3. Preparación del modelo de hebra azúcar β-D-Tal-Py-NHAc (6) por la Ruta B.

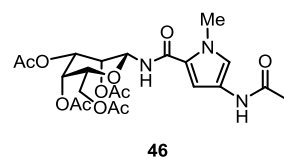
7.3.1. Preparación de HO-Py^B-NO₂^[19] (42)



A una disolución de **MeO-Py^B-NO₂ (16)**, (1g, 5.88 mmol), en THF, (4ml), se añade lentamente una disolución de LiOH·H₂O, (1.0 g, 41.11 mmol), en H₂O (3 ml). Se agita durante 24 h. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lava con una disolución de HCl (1M) hasta pH neutro y se extrae con AcOEt. Se separan las fases y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra. Se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose **HO-Py^B-NO₂ (42)** (865 mg, R = 95%). **¹H NMR (200 MHz, CDCl₃):** δ = 3.98 (s, 3H, CH₃), 7.41 (s, 3H, CH₃), 7.41 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Py), 7.60 (d, J = 1.0 Hz, 1H, Py).

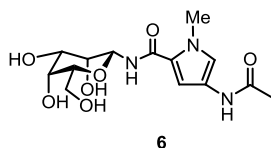
7.3.2. Preparación de β-D-Tal-Py-NHAc (6).

7.3.2.1. Preparación de (AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-NHAc (46).



Una mezcla de **(AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-NO₂ (43)**, (230 mg, 0.46 mmol), y Pd/C (5%), (46 mg), en AcOEt/MeOH (1/1) se hidrogena a presión atmosférica y se agita a temperatura ambiente durante 15 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Nylon para eliminar el Pd/C y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de la amina se disuelve en CH₂Cl₂ (5 ml) y se trata con anhídrido acético, (104 μl, 1.1 mmol), y Et₃N, (153 μl, 1.1 mmol). La disolución se agita 18 h. a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna en AcOEt (100%) obteniéndose el compuesto **(AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-NHAc (46)**. (128 mg, R = 54%). **R_f** = 0.15 AcOEt (100%). **P.f.** = 113-115 °C. **[α]^D** = -10.8 (*c* = 1.25, MeOH). **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)**: δ = 1.90 (s, 3H, AcO), 1.95 (s, 3H, NHAc), 2.00 (s, 3H, AcO), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.15 (s, 3H, AcO), 3.77 (s, 3H, Me^B), 4.07-4.09 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.25 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-5), 5.12 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-2), 5.17 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-4), 5.39 (t, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-3), 5.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1), 6.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Py-3^B), 7.24 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Py-5^B), 8.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH-5), 9.78 (s, 1H, NH-4). **¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃)**: δ = 20.78 (CH₃, AcO), 20.90 (CH₃, AcO), 21.02 (CH₃, AcO), 21.44 (CH₃, AcO), 23.37 (CH₃, AcNH), 36.69 (CH₃, Me^B), 62.12 (CH₂, C-6), 65.57 (CH, C-4), 68.10 (CH, C-2), 68.44 (CH, C-3), 72.85 (CH, C-5), 77.28 (CH, C-1), 105.80 (CH, Py-3^B), 119.18 (CH, Py-4^B), 119.60 (C, Py-2^B), 121.83 (CH, Py-2^B), 160.87 (CO, CO-Py), 166.44 (CO, AcNH), 168.82 (CO, AcO), 169.74 (CO, AcO), 169.89 (CO, AcO), 170.26 (CO, AcO). **HRMS (ESI⁺)**: Calculado para C₂₂H₃₀N₃O₁₁ [M+H]⁺ 512.1875, encontrado 512.1857. **Análisis elemental** calculado (%) para C₂₂H₃₁N₃O₁₂: C, 49.90; H, 5.90; N, 7.93. Hallado: C, 50.20; H, 5.60; N, 7.64. **IR (KBr)**: ν = 1750, 1667, 1252.

7.3.2.2. Preparación de β-D-Tal-Py-NHAc (**6**).

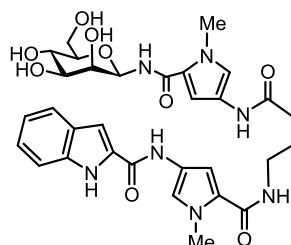


A una disolución de **(AcO)₄-β-D-Tal-Py^B-NHAc (46)**, (53 mg, 0.08 mmol), en metanol se añade una disolución 0.5 M de MeONa en metanol, (144 μl, 0.072 mol), obteniéndose un valor aproximado de pH = 9. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min y se neutraliza utilizando una resina de intercambio Amberlite IR120 (H⁺) hasta pH = 7, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida para obtener el compuesto **β-D-Tal-Py^B-NHAc (6)**.

(25 mg. R = 83%). $R_f = 0.15$ CH₂Cl₂/MeOH (5:1). **P.f.**= 136-138 °C. $[\alpha]^D = +20.7$ ($c = 0.8$, MeOH). **¹H NMR (500 MHz, D₂O):** $\delta = 2.12$ (s, 3H, AcNH-), 3.78-3.82 (m, 3H, H-5, H-6, H-6'), 3.84 (s, 3H, Me^B), 3.90 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-3), 3.96-3.98 (m, 2H, H-4, H-2), 5.29 (s, 1H, H-1), 6.86 (d, $J = 1.9$, 1H, Py-3^B), 7.17 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-5^B). **¹³C NMR (125 MHz, D₂O):** $\delta = 21.99$ (CH₃, AcNH), 36.00 (CH₃, Me^B), 61.20 (CH₂, C-6), 68.44 (CH, C-4), 68.47 (CH, C-3), 70.43 (CH, C-2), 77.01 (CH, C-5), 78.22 (CH, C-1), 107.46 (CH, Py-3^B), 120.31 (C, Py^B), 122.09 (C, Py-5^B), 122.14 (C, Py^B), 163.27 (CO₄), 172.01 (CO, AcNH). **HRMS (ESI+):** Calculado para C₁₄H₂₂N₃O₇ [M+H]⁺ 344.1452, encontrado 344.1466. **IR (KBr):** $\nu = 3355, 3280, 3148, 2928, 2851, 1689, 1526, 1435, 1260, 1042$. **Análisis elemental** calculado % para C₁₄H₂₁O₇N₃: C, 49.98; H, 6.17; N, 12.24. Hallado: C, 49.10; H, 6.15; N, 12.35.

7.4. Preparación de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4), 6-desoxy- β -D-Man (9) y el modelo de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5).

Preparación de β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (1).^[20]

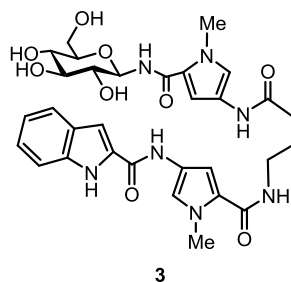


1

A una disolución de (AcO)₄- β -D-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (171 mg, 0.208 mmol) en MeOH (6 ml) se le añade una disolución de MeONa (45 mg, 0.835 mmol) en MeOH (1 ml). La mezcla se deja en agitación 2 h. Se neutraliza la mezcla de reacción hasta pH = 6 con Amberlite IR-120. Tras filtración el disolvente es evaporado a presión reducida. Se purifica el producto de reacción mediante columna cromatográfica en gel de sílice en una mezcla CH₂Cl₂/MeOH/Tolueno, 5/2/1, (v/v/v) obteniéndose el compuesto β -D-Man (1). (108 mg, 79%). $R_f = 0.12$ CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (6/1/0.1). **P.f.**= 165-170 °C. $[\alpha]^D = +9.61$ ($c = 0.77$, MeOH). **¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆):** $\delta = 1.76$ -1.82 (m, 2H, γ -b), 2.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, γ -c), 3.10 (ddd, $J = 9.3, 6.0, 2.2$ Hz m, 1H, H-5), 3.22 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, γ -a), 3.33-3.45 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3.63-3.66 (m, 1H, H-2), 3.65-3.68 (m, 1H, H-6'), 3.79 (s, 3H, Me^A), 3.84 (s, 3H, Me^B), 4.46 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, OH-6), 4.73 (t, $J = 5.48$ Hz, 2H, OH-3, OH-4), 5.10 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, OH-2), 5.13 (d, $J = 9.3$ Hz, H-1), 6.69 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, $J =$

1.9 Hz, Py-3^A), 7.05 (ddd, $J = 8.0, 6.9, 1.0$ Hz, 1H, Ind-5), 7.17-7.21 (m, 2H, Ind-6, P-5^B), 7.28 (m, 2H, Ind-3, Py-5^A), 7.46 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, Ind-7), 7.49 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH-5), 7.64 (dd, $J = 8.0, 0.9$ Hz, 1H, Ind-4), 8.11 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-3), 9.83 (s, 1H, NH-4), 10.29 (s, 1H, NH-2), 11.61 (d, $J = 2.2$ Hz, NH-1). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆)**: $\delta = 25.6$ (CH₂, γ -b), 33.3 (CH₂, γ -c), 36.0 (CH₃, Me^A), 36.1 (CH₃, Me^B), 38.22 (CH₂, γ -a), 61.2 (CH, C-6), 66.6 (CH, C-4), 70.6 (CH, C-2), 73.9 (CH, C-3), 77.1 (CH, C-1), 78.9 (CH, C-5), 102.8 (CH, Ind-3), 103.7 (CH, Py-3^B), 104.0 (CH, Py-3^A), 112.2 (CH, Ind-7), 118.1 (CH, Py-5^A), 118.7 (CH, Py-5^B), 119.8 (CH, Ind-5), 121.5 (CH, Ind-4), 121.5 (C, Py-4^B), 121.6 (C, Py-2^B), 122.2 (C, Py-4^A), 123.1 (C, Py-2^A), 123.3 (CH, Ind-6), 127.0 (C, Ind-3a), 131.6 (C, Ind-2), 136.5 (C, Ind-7a), 158.2 (CO), 159.9 (CO), 161.2 (CO), 169.3 (CO). **HRMS (ESI+)**: Calculado para **C₃₁H₃₈N₇O₉** [M+H]⁺ 652.2726, encontrado 652.2726. **IR (KBr)**: $\nu = 3412$ (ancha), 2930, 2935, 1642, 1589, 1519 cm⁻¹. **Análisis elemental** calculado % para **C₃₁H₃₇N₇O₉**: C, 57.14; H, 5.72; N, 15.05. Hallado: C, 57.19; H, 5.90; N, 15.49.

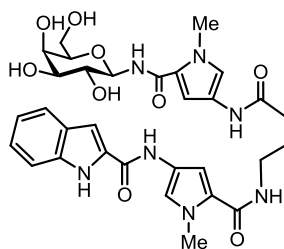
Preparación de β -D-Glc-Py- γ -Py-Ind (**3**).^[20]



A una disolución de (AcO)₄- β -D-Glc-Py^B- β -Py^A-Ind (100 mg, 0.122 mmol) en metanol (10 ml), se añade a 0° C una disolución de MeONa (100 mg, 4.34 mmol) en metanol (10 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna en CH₂Cl₂: MeOH (5:1). Cantidad de producto β -D-Glc-Py- γ -Py-Ind (**3**) obtenido: 50 mg; R = 65%. **R_f** = 0.12 CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (6/1/0.1). **P.f.** = (196-197) °C. **[α]^D** = +12.9 ($c = 0.760$ en DMSO-d₆). **¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆)**: $\delta = 1.79$ (m, 2H, CH₂- γ_b), 2.29 (m, 2H, CH₂- γ_a), 3.21 (m, 2H, CH₂- γ_c), 3.64 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, Me), 3.84 (s, 3H, Me), 4.51 (t, $J = 5.70$ Hz, 1H, CH), 4.81 (d, $J = 5.30$ Hz, 1H, CH), 4.87 (d, $J = 4.40$ Hz, 1H, CH), 4.96 (d, $J = 4.00$ Hz, 1H, CH), 6.85 (d, $J = 1.70$ Hz, 1H, Py), 6.90 (d, $J = 1.70$ Hz, 1H, Py), 7.06 (m, 1H, Py), 7.19 (m, 2H, CH x 2, Py, Ind), 7.28 (s, 2H, Ind), 7.46 (d, $J = 8.20$ Hz, 1H, Ind), 7.65 (d, $J = 7.90$ Hz, 1H, Ind), 8.13 (t, $J = 4.90$ Hz, 1H, NH), 8.36 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H, Ind), 9.82 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H,

NH), 11.60 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.6 ($\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 33.3($\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 35.8 (CH_3), 36.0 (CH_3), 38.2($\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 61.0 (CH_2), 70.1 (CH), 71.8 (CH), 77.6 (CH), 78.4 (CH), 79.6 (CH), 103.2 (CH, Ind), 104.1 (CH py), 104.5 (CH, Py), 112.5 (CH, Ind), 118.2 (CH py), 119.6 (CH py), 121.5 (CH, Ind), 121.8 (CH, Ind), 121.8 (C), 122.2 (C), 123.2 (C), 123.2 (CH), 127.0 (C), 131.6 (C), 136.5 (C), 141.3 (C), 158.1 (CO), 161.1 (CO), 161.1 (CO), 169.6 (CO). **E. M. (ES +) m/z (%)**: 652 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 674 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1304 $[2\text{M} + \text{H}]^+$. **IR (KBr) (cm^{-1})**: 3600-2800, 1638, 1584, 1532. **Análisis elemental** calculado % para $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_9$: C, 57.14; H, 5.72; N, 15.05. Hallado: C, 57.19; H, 5.68; N, 15.1.

Preparación de $\beta\text{-D-Gal-Py}^{\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Py}^{\text{A}}\text{-Ind}$ (4).^[20]

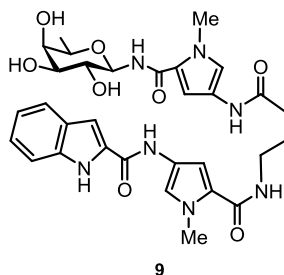


4

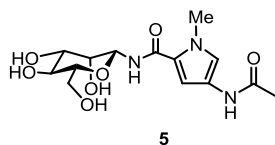
El compuesto **4** fue preparado por el mismo método de obtención que compuesto $\beta\text{-D-Glc-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ (**3**) a partir de $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-D-Gal-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ (92 mg, 0.112 mmol). Cantidad de producto obtenido: 50 mg; R = 65%. R_f = 0.12 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (6/1/0.1). **P.f.** = 200 °C, $[\alpha]_D^{20}$ = +23.7 (c = 1.35 en DMSO- d_6); ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.79 (m, $\text{CH}_2\text{-}\gamma_{\text{b}}$, 2H), 2.28 (m, $\text{CH}_2\text{-}\gamma_{\text{a}}$, 2H), 3.22 (m, $\text{CH}_2\text{-}\gamma_{\text{c}}$, 2H), 3.30-3.54 (m, 3H), 3.57-3.64 (m, 2H), 3.70 (d, J = 2.70 Hz, CH, 1H), 3.79 (s, 3H, Me), 3.84 (s, 3H, Me), 4.83 (t, J = 8.90 Hz, 1H, CH), 6.85 (d, J = 1.70 Hz, 1H, Py), 6.89 (d, J = 1.70 Hz, 1H, Py), 7.05 (t, J = 8.00 Hz, 1H, Ind), 7.20 (m, 2H, CH x 2), 7.28 (s, 2H, CH x 2), 7.53 (d, J = 8.20 Hz, 1H, Ind), 7.64 (d, J = 8.20 Hz, 1H, Ind), 8.12 (t, J = 5.70 Hz, 1H, NH), 8.36 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ind), 9.83 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, NH), 11.61 (d, J = 1.50 Hz, 1H, NH). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.6 ($\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 33.3($\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 36.0 (CH_3), 36.1 (CH_3), 38.2($\text{CH}_2\text{-}\gamma$), 60.4 (CH_2), 66.3 (CH), 69.1 (CH), 74.3 (CH), 76.6 (CH), 80.1 (CH), 102.8 (CH), 104.1 (CH), 104.5 (CH), 112.2 (CH), 118.0 (CH), 118.4 (CH), 119.6 (CH), 121.4 (CH), 121.5 (C), 121.8 (C), 122.2 (C), 123.2 (CH), 127.0 (C), 131.5 (C), 136.5 (C), 141.3 (C), 158.1 (CO), 161.1 (CO), 161.1 (CO), 169.2 (CO). **E. M. (ES +) m/z (%)**: 653 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 675 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1304 $[2\text{M} + \text{H}]^+$. **IR (KBr) (cm^{-1})**: (3600-2500),

1643, 1584, 1530. **Análisis elemental** calculado % para $C_{31}H_{41}N_7O_{11}$: C, 54.14; H, 6.01; N, 14.26. Hallado: C, 54.14; H, 6.02; N, 14.35.

Preparación de 6-desoxy- β -D-Man-Py^B- γ -Py^A-Ind (9**).^[20]**



El compuesto **9** fue sintetizado por el mismo procedimiento que el compuesto **1** a partir de **6-desoxy-(AcO)₃- β -D-Man-Py- γ -Py-Ind** (150 mg, 0.186 mmol). Cantidad de producto obtenido: 95 mg; R = 80%. R_f = 0.12 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$ (6/1/0.1). $P.f.$ = 175-180 °C. $[\alpha]_D^{25} = -23.2$ (c = 0.97, MeOH). **¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6)**: δ = 1.14 (d, J = 5.5 Hz, 3H), 1.75 – 1.83 (m, 2H, γ -b), 2.28 (t, J = 7.5 Hz, 2H, γ -c), 3.12 – 3.17 (m, 2H, H-4, H-5), 3.20 – 3.25 (m, 2H, γ -a), 3.3 (overlap, 1H, H-3), 3.61 – 3.67 (m, 1H, H-2), 3.79 (s, 3H, Me^B), 3.84 (s, 3H, Me^A), 4.70 (d, J = 5.9 Hz, 1H, OH-3), 4.77 (d, J = 5.0 Hz, 1H, OH-4), 5.09 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H-1, OH-2), 6.69 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Py-3^B), 6.89 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Py-3^A), 7.05 (ddd, J = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H, Ind-5), 7.14 – 7.23 (m, 2H, Ind-6, Py-5^B), 7.28 (t, J = 2.1 Hz, 2H, Ind-3, Py-5^A), 7.45 – 7.48 (m, 2H, NH-5, Ind-7), 7.65 (m, 1H, Ind-4), 8.10 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH-3), 9.82 (s, 1H, NH-4), 10.28 (s, 1H, NH-2), 11.60 (d, J = 2.2 Hz, 1H, NH-1). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6)**: δ = 17.97 (CH₃, Me), 25.62 (CH₂, γ -b), 33.27 (CH₂, γ -c), 36.06 (CH₃, Me^A), 36.12 (CH₃, Me^B), 38.18 (CH₂, γ -a), 70.82 (CH, C-2), 71.73 (CH, C-4), 73.48 (CH, C-5), 73.72 (CH, C-3), 77.15 (CH, C-1), 102.80 (CH, Ind-3), 103.89 (CH, Py-3^B), 104.08 (CH, Py-3^A), 112.29 (CH, Ind-7), 118.09 (CH, Py-5^A), 118.76 (CH, Py-5^B), 119.77 (CH, Ind-5), 121.52 (CH, Py-4^A), 121.62 (CH, Ind-4), 121.71 (CH, Py-2^B), 122.24 (CH, Py-4^B), 123.22 (CH, Py-2^A), 123.36 (CH, Ind-6), 127.12 (C, Ind-3a), 131.65 (C, Ind-2), 136.57 (C, Ind-7a), 158.19 (CO), 160.03 (CO), 161.19 (CO), 169.25 (CO). **HRMS (ESI+)** Calculado para $C_{31}H_{37}N_7O_8$ $[M+H]^+$ 636.2776, encontrado 636.2771. **IR (KBr)**: ν = 3429 (ancha), 2930, 1640, 1591, 1518, 1645, 1438, 1403, 1341, 1307, 1250, 1146, 1067, 1014, 892, 748, 576 cm^{-1} . **Análisis elemental** calculado % para $C_{31}H_{37}N_7O_8$: C, 58.57; H, 5.87; N, 15.42. Hallado: C, 58.49; H, 5.79; N, 15.62.

Preparación del modelo de hebra azúcar β -D-Man-Py-NHAc (5).^[20]

El compuesto **5** fue sintetizado por el mismo procedimiento que el compuesto **β -D-Man (1)** a partir de **(AcO)₄- β -D-Man-Py-NHAc** (120 mg, 0.234 mmol). Cantidad de producto obtenido: 60 mg; R = 75%. R_f = 0.15 CH₂Cl₂/MeOH (5:1). P.f. = 148 °C. **¹H NMR (500 MHz, DMSO):** δ = 1.95 (s, 3H, AcNH-), 3.10 (ddd, J = 9.1, 6.0, 2.2 Hz, 1H, H-5), 3.34-3.40 (m, 2H, H-3, H-2), 3.40-3.46 (m, 1H, H-6), 3.63-3.65 (m, 1H, H-4), 3.65-3.69 (m, 1H, H-6'), 3.79 (s, 3H, Me^B), 4.46 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OH-6), 4.74 (t, J = 4.74 Hz, 2H, OH-2, OH-3), 5.10 (d, J = 4.5 Hz, 1H, OH-4), 5.14 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-1), 6.67 (d, J = 1.9, 1H, Py-3^B), 7.15 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Py-5^B), 7.49 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH-5), 9.80 (s, 1H, NH-4). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO):** δ = 23.06 (CH₃, AcNH), 36.14 (CH₃, Me^B), 61.21 (CH₂, C-6), 66.73 (CH, C-3), 70.74 (CH, C-4), 74.01 (CH, C-2), 77.15 (CH, C-1), 78.96 (CH, C-5), 103.76 (CH, Py-3^B), 118.62 (CH, Py-5^B), 121.74 (C, Py-2^B), 122.30 (CH, Py-4^B), 159.94 (CO₄), 166.49 (CO, AcNH). **¹H NMR (500 MHz, D₂O):** δ = 2.12 (s, 3H, AcNH-), 3.53 (ddd, J = 9.8, 5.9, 2.1 Hz, 1H, H-5), 3.62-3.66 (m, 1H, H-4), 3.73-3.80 (m, 2H, H-6', H-3), 3.83 (s, 3H, Me^B), 3.92-3.93 (m, 1H, H-6), 4.04 (dd, J = 3.3, 0.9 Hz, 1H, H-2), 5.35 (s, 1H, H-1), 6.84 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Py-3^B), 7.15 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Py-5^B). **¹³C NMR (125 MHz, D₂O):** δ = 2.96 (CH₃, AcNH), 35.95 (CH₃, Me^B), 60.84 (CH₂, C-6), 66.37 (CH, C-4), 70.27 (CH, C-2), 73.28 (CH, C-3), 77.69 (CH, C-5), 77.72 (CH, C-1), 107.41 (CH, Py-3^B), 120.26 (C, Py^B), 122.02 (C, Py-5^B), 122.18 (C, Py^B), 163.22 (CO₄), 172.05 (CO, AcNH). **HRMS (ESI+):** Calculado para C₁₄H₂₂N₃O₇ [M+H]⁺ 344.1452, encontrado 344.1461; Calculado para C₁₄H₂₁N₃NaO₇ [M+Na]⁺ 366.1272, encontrado 366.1262.

7.5. Referencias.

- [1] Armarego, W. L. P., D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth-Heinemann, 1996.
- [2] Still, W. C. K., M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [3] Bhattacharjee, A. K.; Zissis, E.; Glaudemans, C. P. J. *Carbohydr. Res.* **1981**, *89*, 249-254.
- [4] Acher, A. J.; Shapiro, D. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2652-2654.
- [5] Hodosi, G.; Kováč, P. *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 557-565.
- [6] Hodosi, G.; Kováč, P. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 239-243.
- [7] Xiao, H.; Wang, G.; Wang, P.; Li, Y. *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 1229-1232.
- [8] Pfeffer, P. E.; Valentine, K. M.; Parrish, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1265-1274.
- [9] Sawada, M.; Shizuma, M.; Takai, Y.; Yamada, H.; Tanaka, T.; Okumura, Y.; Hidaka, Y.; Hanafusa, T.; Takahashi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1275-1279.
- [10] Banwell, M. G. E., A. J.; Lambert, J. N.; Ma, X. H.; Watson, K. G. *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 95-103.
- [11] Kopitzki, S.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 4008-4016.
- [12] Gelas, J.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 103-121.
- [13] Número CAS: 10030-80-5; Catálogo Alfa-Aesar; 2013, Ref:A17722-1g, 111.0 euros.
- [14] Ermolenko, L.; Sasaki, N. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 693-703.
- [15] El valor de $[\alpha]_D$ se corresponde con el de la mezcla de anómeros α/β (0.15/1).
- [16] (a) Se incluye sólo el último paso de la síntesis por estar descrita la ruta sintética previamente en nuestro grupo, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10870-10881.
- [17] Para ver los datos espectroscópicos de 38, ver apartado 7.2.2.2.1.
- [18] Para ver los datos espectroscópicos de 39, ver apartado 7.2.2.2.2.
- [19] Otsuka, M.; Masuda, T.; Haupt, A.; Ohno, M.; Shiraki, T.; Sugiura, Y.; Maeda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838-845.
- [20] La descripción de la ruta sintética no es objeto de estudio de esta tesis por haber sido previamente sintetizado en nuestro grupo.

8. PARTE EXPERIMENTAL: CARACTERIZACIÓN DE EHs Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN POR RMN.

8.1. General.

La acetona- d_6 empleada en los experimentos de caracterización de EHs se adquirió en SDS y se utilizó sin purificación ni secado adicional.

El D_2O se adquirió en Sigma-Aldrich y el H_2O empleada en los experimentos de caracterización de EHs fue purificada con un sistema Mili-Q.

El ADN de timo de bovino (ct-ADN, ref: D3664) y el poly(dA-dT) $_2$ (ref: P0883) fue suministrado por Sigma-Aldrich y utilizado sin purificación adicional alguna.

La disolución 10mM de tampón fosfato se preparó como sigue:

Se preparan dos disoluciones madre concentradas de las sales mono y di-básica de fosfato sódico (A y B respectivamente):

A: Disolución 0.2 M de fosfato sódico monobásico (27.8 g en 100 ml de agua destilada)

B: Disolución 0.2 M de fosfato sódico dibásico (53.65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ en 1000 ml de agua destilada).

Así, la disolución de tampón fosfato 10 mM (pH 7.0) se obtiene mezclando 3.9 ml de A y 6.1 ml de B y diluyendo hasta un volumen final de 200 ml con agua destilada. Esta solución tampón se preparaba cada semana para evitar problemas de deterioro.

8.2. Instrumentación.

Los espectros de absorción de UV/Vis de las muestras de ADN fueron registrados con un espectrofotómetro UV/Visible Perkin-Elmer Lambda 35 de doble haz en el laboratorio de Dra. Paula Bosch del Instituto de Ciencia y tecnología de Polímeros (C.S.I.C., Madrid).

Los estudios conformacionales por RMN de nuestros ligandos en el estado libre o asociados a ADN se llevaron a cabo en espectrómetros Varian de 400 y 500 MHz en el Instituto de Química Orgánica General (C.S.I.C, Madrid), en el equipo Bruker Avance (500 MHz) en el laboratorio del Dr. Jesús Jiménez-Barbero en el Centro de Investigaciones Biológicas del (C.S.I.C, Madrid) y en el espectrómetro Bruker DMX (500 MHz) de la unidad SIDI de la Universidad Autónoma de Madrid.

8.3. Caracterización estructural de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4) y sus modelos de hebra carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (5), β -D-Tal-Py-NHAc (6) en disolución acuosa mediante RMN a baja temperatura.

8.3.1. Preparación de las disoluciones utilizadas en los experimentos de RMN a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las disoluciones de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra azúcar **5** y **6** se prepararon en un rango de concentraciones entre 200 y 1000 μM en función de la solubilidad de los compuestos.

El protocolo empleado en la preparación de las muestras para los experimentos de caracterización de EHs por RMN a baja temperatura es el que sigue:

Se disuelve alrededor de 1 mg de compuesto en la cantidad correspondiente de metanol deuterado (CD_3OD) para obtener una disolución 1mM de compuesto. Una alícuota de esta disolución se trasvasa a un tubo de microcentrífuga (comúnmente apodados "eppendorf"). El volumen de alícuota ha de ser tal que al re-suspender el residuo en 500 μl de disolución acuosa obtengamos la concentración deseada. A continuación, se evapora el disolvente, a alto vacío, en un liofilizador obteniéndose un residuo. El residuo obtenido se re-suspende en 500 μl de una mezcla H_2O /Acetona- d_6 (90:10) (100 μM TSP- d_4 , $\text{pH}=6.9\pm0.1$). El tubo que contiene la disolución acuosa del compuesto se somete a la irradiación de ultrasonidos durante 5 min para una mejor disolución del mismo. La concentración final en el tubo de RMN del patrón interno TSP- d_4 (0.00 ppm) utilizada fue, generalmente, de 100 μM .

La concentración de las glico-oligoamidas en el tubo de resonancia se determinó por ^1H -RMN, mediante la comparación de integrales respecto al patrón interno TSP- d_4 (3-(trimetilsilil)propionato-2,2,3,3- d_4 de sodio).

8.3.2. Asignación del espectro de ^1H -RMN y estudio conformacional de las glico-oligoamidas 1-4 y los modelos de hebra carbohidrato 5 y 6 a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La asignación de las resonancias de los espectros de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-4** y los modelos de hebra azúcar **5** y **6** se llevó a cabo mediante experimentos de RMN mono y bidimensionales en una mezcla H_2O /Acetona- d_6 (90:10) a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el fin de detectar las resonancias de los protones intercambiables.

Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) en relación a la referencia interna TSP- d_4 (3-(trimetilsilil)propionato-2,2,3,3- d_4 de sodio) (0.00 ppm).

Los experimentos 1D (^1H -RMN) y 2D (TOCSY y NOESY) se llevaron a cabo usando “sculpting excitation” con método de gradientes para suprimir la señal del agua empleándose una secuencia de pulsos estándar. Los experimentos TOCSY y NOESY fueron llevados a cabo con un tiempo de mezcla de 60 y 400 ms respectivamente a $-15\text{ }^\circ\text{C}$.

La detección y asignación de las resonancias de los protones NH amídicos y OHs intercambiables se realizó mediante los espectros de ^1H -RMN TOCSY y NOESY en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetona-d}_6$ (90:10) a $-15\text{ }^\circ\text{C}$.

Los experimentos a baja temperatura ($-15\text{ }^\circ\text{C}$) se realizaron en un espectrómetro Bruker DMX (500 MHz) de la unidad SIDI en la Universidad Autónoma de Madrid.

8.3.3. Experimentos de dilución de las glico-oligoamidas **1** y **2** por ^1H -RMN a $5\text{ }^\circ\text{C}$.

Se prepararon disoluciones de las glico-oligoamidas **1** y **2** en D_2O a una concentración en torno a $500\text{ }\mu\text{M}$. Esta concentración se determinó por ^1H -RMN, mediante la comparación de integrales respecto al patrón interno TSP-d4 (0.00 ppm, $c=100\text{ }\mu\text{M}$).

Se llevaron a cabo experimentos de dilución de las glico-oligoamidas **1** y **2** por ^1H -RMN en D_2O a $5\text{ }^\circ\text{C}$ en un rango de concentración entre $5\text{-}500\text{ }\mu\text{M}$. En el tubo de RMN se introdujeron 0.5 ml de la disolución inicial ($\sim 500\text{ }\mu\text{M}$), que se diluyó mediante la adición de cantidades crecientes de disolvente hasta alcanzar una concentración $\sim 4\text{ }\mu\text{M}$ que es el límite de detección del espectrómetro de 500 MHz . En este rango de concentraciones ($5\text{-}500\text{ }\mu\text{M}$) no se detectaron diferencias en los desplazamientos químicos que puedan asociarse a procesos de auto-asociación en este rango de temperaturas. (Ver figura 4.7, capítulo 4).

Esto sugiere que las glico-oligoamidas se encontraban como especies monoméricas en el rango de concentración utilizado en los estudios por RMN

8.3.4. Experimentos para la caracterización de enlaces de hidrógeno por RMN a baja temperatura.

Los valores de coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) de las resonancias de los protones intercambiables de los compuestos **1-6** en H_2O fueron obtenidos mediante experimentos de ^1H -RMN de temperatura variable y TOCSY (en el caso de los protones intercambiables OH-2 y OH-4 de la glico-oligoamida **β -D-Tal (2)**). Los experimentos de 1D (^1H -RMN) y 2D (TOCSY, NOESY) fueron llevados a cabo a concentraciones de glico-oligoamidas en un rango entre 10^3

$4-10^{-3}$ M dependiendo de la solubilidad del compuesto en agua. Se registraron espectros de ^1H -RMN a cuatro temperaturas diferentes en el rango de $-15 - 0^\circ\text{C}$.

Los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables OH-2 y OH-4 de **β -D-Tal (2)** se calcularon a partir de experimentos TOCSY registrados también a cuatro temperaturas diferentes. Los valores de coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) se calcularon mediante ajuste lineal. (Ver tablas Tablas 9.1-9.6 y figuras 9.3-9.8 del anexo).

Para la detección del nOe NH-5...OH-2 en el compuesto **β -D-Man (1)** se llevo a cabo un experimento NOESY utilizando un tiempo de mezcla de 400 ms en una mezcla H_2O /Acetona- d_6 (90:10) a una temperatura de -15°C .

8.4. Caracterización estructural de las glico-oligoamidas **β -D-Man (1)**, **β -D-Tal (2)**, **β -L-Man (7)**, **β -L-Gal (8)** y **6-desoxy- β -D-Man (9)** por RMN a temperatura ambiente y a 5°C en agua.

8.4.1. Preparación de las muestras utilizadas en los experimentos de RMN a 25 y 5°C .

Las disoluciones de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9** se prepararon en un rango de concentraciones entre 200 y 800 μM en función de la solubilidad de los compuestos.

La concentración de las glico-oligoamidas en el tubo de resonancia se determinó por ^1H -RMN, mediante la comparación de integrales respecto al patrón interno TSP- d_4 (3-(trimetilsilil)propionato-2,2,3,3- d_4 de sodio).

El protocolo empleado en la preparación de las muestras para la posterior asignación y caracterización de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9** en disolución acuosa por RMN es el que sigue:

Se disuelve 1 mg de compuesto en la cantidad correspondiente de metanol deuterado (CD_3OD) para obtener una disolución 1mM de compuesto. Una alícuota de esta disolución se trasvasa a un tubo de microcentrifuga (comúnmente apodados "eppendorf"). A continuación, se evapora el disolvente, a alto vacío, en un liofilizador obteniéndose un residuo. El residuo obtenido, dependiendo del experimento que queramos llevar a cabo, se re-suspende en agua, (conteniendo el patrón interno TSP (100 μM), en un volumen tal que obtengamos una concentración en el rango de $10^{-3}-10^{-4}$ M según los siguientes protocolos:

- En 500 μl de D_2O .
- En 500 μl de una disolución tampón (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4). (Ver apartado 8.1). La disolución tampón se prepara a partir de una disolución tampón madre, (ver

apartado 8.1), se trasvasa una alícuota de ésta a un tubo de microcentrífuga, Se evapora el disolvente a alto vacío obteniéndose un residuo que se re-suspende en una cantidad de D_2O tal que obtengamos una concentración de tampón de 10 mM (pH =7.0). Esta disolución tampón es en la que se re-suspende el compuesto.

c) En 500 μ l de H_2O con un capilar externo de D_2O .

El tubo que contiene la disolución acuosa del compuesto se somete a la irradiación de ultrasonidos durante 5 min para una mejor disolución del mismo. En el caso del protocolo c) el capilar externo se introduce en el tubo de RMN tras la sonicación de la muestra.

8.4.2. Asignación del espectro de 1H -RMN y estudio conformacional de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9**.

La asignación de las resonancias de los espectros de 1H -RMN de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9** se llevó a cabo mediante experimentos de RMN mono y bidimensionales en H_2O con un capilar externo de D_2O a 5 °C (protocolo c)) y en D_2O a 25 °C (protocolo a)).

Los experimentos en D_2O a temperatura ambiente se realizaron en un espectrómetro Varian Unity-500. Los realizados en una mezcla H_2O/D_2O (90:10) se llevaron a cabo en el espectrómetro Bruker Avance (500 MHz).

Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) en relación a la referencia interna TSP-d4 (3-(trimetilsilil)propionato-2,2,3,3- d_4 de sodio) (0.00 ppm).

Los experimentos fueron realizados con supresión de la señal residual de HDO, utilizando una secuencia de pulsos “3-9-19” watergate” con gradientes o mediante presaturación previa.

Los espectros fueron procesados utilizando el programa XWIN-NMR 3.5 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) o con Mestrenova Mestrelab Research S.L. Santiago de Compostela, Spain.

La detección y asignación de las resonancias de los protones NH amídicos intercambiables se realizó mediante los espectros de RMN TOCSY (60-80 ms) y ROESY (200 ms) en H_2O con un capilar externo de D_2O a 5 °C. Estos experimentos permitieron la asignación de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas **1, 2, 7-9** en D_2O para estudiar la conformación de las mismas a temperatura ambiente.

8.5. Estudio de la interacción de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -L-Man (7) y β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

En este apartado se describe la parte experimental de los estudios de afinidad y estructurales llevados a cabo con las glico-oligoamidas **1-4**, **7-9** y varios tipos de ADN (ct-ADN y poly(dA-dT)₂ mediante el empleo de RMN.

Los disolventes deuterados se adquirieron en Merck o en Aldrich y se usaron sin purificación adicional. El ADN de timo de bovino (ct-ADN, ref: D3664, 2mg) y el Poly(dA-dT)₂ (ref: P0883, 50 UN) fue suministrado por Sigma-Aldrich y utilizado sin purificación adicional alguna. La netropsina fue adquirida en Fluka y se usó sin purificación adicional.

Las medidas de RMN se llevaron a cabo un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz a 25°C utilizando siempre un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s), el mismo número de scans (ns=64) para cada espectro y manteniendo constante el valor de la ganancia del espectrómetro.

Los espectros fueron procesados utilizando el programa XWIN-NMR 3.5 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) o con Mestrenova (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, Spain). Los experimentos fueron realizados con supresión de la señal residual de HDO, utilizando la secuencia de pulsos “3-9-19 watergate” con gradientes o mediante presaturación previa.

Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) en relación al estándar TSP (0.00 ppm).

8.5.1. Medida de las concentraciones de los polímeros de ADN mediante espectroscopía UV/Vis.

Los espectros de absorción de UV/Vis de las muestras fueron registrados a temperatura ambiente con un espectrofotómetro UV/Visible Perkin-Elmer Lambda 35 de doble haz a 25°C, haciendo uso de cubetas de cuarzo con un camino óptico de 1 cm y utilizando como referencia una cubeta con el disolvente puro correspondiente. El intervalo de longitudes de onda estudiado es el comprendido entre 200-400 nm.

El cálculo de concentraciones por UV de las disoluciones de los polímeros de ct-ADN y poly(dA-dT)₂ se llevó a cabo mediante la medida de la absorbancia de las disoluciones de ambos polímeros mediante el empleo de la ley de Lambert-Beer:

$$A^{\lambda} = \varepsilon^{\lambda} \cdot l \cdot c$$

donde A es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda λ , ε es el coeficiente de extinción molar (expresado como $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) a la longitud de onda λ , l es el paso óptico de la cubeta (1 cm) y c es la concentración molar de la muestra.

La concentración de ADN (en pares de bases) se determina mediante la medida de la absorbancia por espectroscopia de absorción UV/Vis usando un coeficiente de extinción molar (en pares de bases) de $12824 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ a 260 nm para ct-ADN (calf-thymus-DNA) y de $13200 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ a 260 nm para poly(dA-dT)₂, de acuerdo con los valores descritos en la bibliografía.^[1]

Para calcular la concentración de las disoluciones de ADN es necesario emplear muestras diluidas. Para evitar problemas de saturación en el espectro de UV, la absorbancia debe de ser menor de 1 (O.D.). Estas muestras se prepararon por dilución de un volumen conocido de disolución problema en una cantidad conocida de disolvente. La concentración inicial de ADN se calculó a partir del valor de A_{260nm} obtenido para la disolución diluida correspondiente.

En todas las muestras, se comprobó previamente la pureza del ADN utilizado mediante el cálculo de la relación entre los valores de absorbancia a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}). De modo que si $A_{260}/A_{280} = 1.80-2.00$, el ADN no está contaminado y puede usarse para el estudio en cuestión. Si, por el contrario, $A_{260}/A_{280} < 1.80$, podemos deducir que el ADN está contaminado con proteínas. Si $A_{260}/A_{280} > 2.00$ podemos deducir que el ADN está contaminado con ARN. En todos nuestros experimentos de interacción, con polímeros de ADN, comprobamos que la relación A_{260}/A_{280} estaba entre 1.80 y 2.00, antes de realizar la valoración.

Los polímeros de ADN (ct-ADN, poly(dA-dT)₂) se disolvieron, en 0.7 ml de disolución acuosa de tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄, pH=7.2). En todos los casos, para solubilizar el ADN en las disoluciones tampón empleadas, fue necesario someter la muestra a la irradiación por ultrasonidos. El tiempo de irradiación en el baño de ultrasonidos nunca fue superior a 10 min.

8.5.2. Preparación de los complejos con ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

Las disoluciones de las glico-oligoamidas empleadas en los estudios de afinidad y estructurales **1-4** y **7-9** se prepararon en un rango de concentraciones entre 90 y 900 μM en función de la solubilidad de los compuestos.

Las disoluciones acuosas de los ligandos se prepararon siguiendo el protocolo b) del apartado 8.4.1 (Ver apartado 8.4.1).

Las concentraciones de los polímeros de ADN (ct-DNA y poly(dAdT)₂) fueron calculadas por espectroscopia UV/Vis, usando los coeficientes de extinción molar descritos en la bibliografía para el ADN ($\epsilon^{262\text{nm}}$ poly(dAdT)₂ = 13200 M⁻¹ cm⁻¹ y $\epsilon^{260\text{nm}}$ ct-DNA = 12824 M⁻¹ cm⁻¹; concentración en pares de bases)^[1] como se indicó en el apartado 8.5.1.

Para la preparación de los polímeros de ADN se han seguido dos protocolos diferentes dependiendo del tipo de experimento a realizar posteriormente. Así, los polímeros de ADN, ct-ADN (2 mg), poly(dA-dT)₂ (50UN), se disolvieron, en 0.7 ml de una disolución:

- a) tampón fosfato 10 mM preparada de la misma forma que en el apartado 8.4.1 b).
- b) conteniendo el ligando en la misma concentración que la disolución a valorar para que la concentración del ligando permanezca constante a lo largo del experimento a llevar a cabo.

En ambos protocolos la disolución de ADN ha contenido el patrón interno TPS en la misma concentración que en la disolución de ligando.

En todos los casos para solubilizar las muestras con ADN en la disolución tampón empleada fue necesario someter la muestra a la irradiación por ultrasonidos. El tiempo de irradiación en el baño de ultrasonidos nunca fue superior a 10 min.

8.5.3. Unión al surco menor del ADN. Experimentos de competición con netropsina.

Para demostrar que las glico-oligoamidas objeto de estudio de esta tesis son ligandos del surco menor del ADN se llevaron a cabo una serie de experimentos de competición entre las glico-oligoamidas **1, 2, 7 y 9** y la netropsina en su asociación a ct-ADN.

Los experimentos de competición con netropsina se realizaron en una disolución tampón D₂O preparada según se describe en el protocolo b) (apartado 8.4.1).

El protocolo del experimento de competición consiste en añadir, a una disolución de glico-oligoamida ($\approx 10^{-4}$ M) cantidades crecientes de una disolución de ct-ADN ($\approx 5-6$ mM),

conteniendo la glico-oligoamida en la misma concentración que la disolución a valorar, preparada mediante el protocolo del apartado 8.5.2.b). Se añaden alicuotas al tubo de RMN hasta la desaparición de las señales aromáticas de la glico-oligoamida en el espectro.¹

Así, la concentración de las glico-oligoamidas se mantuvo constante durante el experimento.

Tras la completa desaparición de las señales de la glico-oligoamida (en estas condiciones, se considera que gran parte de la glico-oligoamida está complejoado con el ADN). Se añaden cantidades crecientes de una disolución de netropsina ($c=10^{-2}$ M) en tampón a la muestra y se registran espectros de ^1H -RMN tras cada adición. De esta manera, se puede observar la aparición progresiva en el espectro las señales correspondientes a la glico-oligoamida. Al final del experimento se añadió un exceso de netropsina que desplazó por completo a la glico-oligoamida del complejo, apareciendo ésta por completo en el espectro de ^1H -RMN. (Ver figuras 9.9–9.11 del anexo).

Los espectros de ^1H -RMN se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz) según se describe al principio del apartado 8.5.

8.5.4. Estudios de selectividad de secuencia: Valoraciones de la glico-oligoamida β -D-Man (1) con polímeros de ADN: ct-ADN y poly(dA-dT)₂.

La concentración de la disolución de ligando **1** utilizada en las valoraciones fue de 200 μM para la valoración con ct-ADN y 250 μM para la valoración con poly(dA-dT)₂.

La disolución de glico-oligoamida **1** a valorar se preparó siguiendo el protocolo 8.4.1 b). (Ver apartado 8.4.1).

Por otro lado, se prepararon disoluciones ~5-6 mM (bp) tanto de ct-ADN como de poly(dA-dT)₂ siguiendo el protocolo del apartado 8.5.2.b).

En el tubo de RMN se añadieron 500 μL de la disolución de la glico-oligoamida **1**. A continuación, se adicionaron cantidades crecientes de la disolución de ADN ($c= 5\text{-}6$ Mm (bp)) , conteniendo el ligando en la misma concentración que en la disolución a valorar. Se siguió el ensanchamiento y la desaparición progresiva de las resonancias pertenecientes a los protones

¹ En algunos casos no fue posible la completa desaparición de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas.

del compuesto valorado. Tras cada adición, se registró un espectro de ^1H -RMN utilizando las mismas condiciones de adquisición a lo largo de toda la valoración.

Los espectros de ^1H -RMN se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz) según se describe al principio del apartado 8.5.

8.5.5. Experimento de competición por DF-STD entre β -D-Man (1) y β -D-Man-Py-NHAc (5) con poly(dA-dT)₂.

La concentración de la disolución mezcla de los compuestos **1** y **5** fue de 200 μM para ambos compuestos en tampón fosfato. Esta disolución mezcla se preparó mediante la dilución correspondiente de una disolución 340 μM de **1** y 680 μM de **5**. Ambas disoluciones fueron preparadas siguiendo el protocolo b) del apartado 8.4.1.

Por otro lado, se preparó una disolución de poly(dA-dT)₂ de la misma manera que en el apartado 8.5.2. a).

Se realizaron los correspondientes experimentos control² a la frecuencia de irradiación seleccionada (5.6 ppm) tanto para el compuesto **1** como para el compuesto **5** en ausencia de ADN. Los experimentos control consistieron en registrar los espectros STD de los compuestos **1** y **5** en ausencia de ADN. Dichos experimentos control indicaron que no había efectos de saturación indirecta sobre los protones del ligando cuando se irradiaba a dicha frecuencia.

Los experimentos control confirmaron que los compuestos estudiados, recibían una saturación menor del 5% al irradiar en la zona de las resonancias de los protones a H1' (5.6 ppm) en ausencia de ADN.

Previo al experimento STD de competición se realizaron experimentos STD de cada uno de los compuestos **1** y **5** con poly(dA-dT)₂.

Para la realización de dichos experimentos se llevó a cabo la adición de una disolución de poly(dA-dT)₂, (preparada según protocolo a) del apartado 8.5.2), a cada una de las disoluciones de los compuestos **1** y **5** hasta alcanzar una relación molar compuesto/ADN 4/1 en ambos casos.

² Ver figuras 9.19 y 9.20 del anexo.

A continuación se procedió a la irradiación selectiva de poly(dA-dT)₂ a 5.6 ppm, (zona del protón H1' de la desoxirribosa del ADN), llevada a cabo eligiendo un tiempo de saturación de 400 ms.

Se optimizó la frecuencia de saturación mediante la realización de una batería de experimentos a distintos tiempos de saturación (50, 150, 250, 300, 400 ms). Para la saturación selectiva en los experimentos STD se eligió un tiempo de saturación global de 400 ms (L6=8) mediante un tren de 8 pulsos Gaussianos con una duración de 49 ms cada uno y 50 dB de atenuación, y con un “*delay*” entre ellos de 1 ms.^[2] El *delay* de relajación (d1) fue de 1.0 s.

Para el experimento de competición, y tras preparación de la disolución mezcla de compuestos **1+5** se llevó a cabo la adición de una disolución de poly(dA-dT)₂ a la disolución mezcla hasta alcanzar una relación molar (**1**)/(**5**)/poly(dA-dT)₂, 4/4/1.

A continuación se procedió a la irradiación selectiva de poly(dA-dT)₂ a 5.6 ppm llevada a cabo eligiendo el tiempo de saturación de 400 ms seleccionado .

Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz) según se describe al principio del apartado 8.5.

Para los experimentos de STD, se utilizó una versión pseudo-2D para las adquisiciones de los espectros on- y off-resonance intercaladas. La duración del pulso de saturación, la potencia del pulso Gaussiano selectivo y el tiempo de recuperación fueron optimizados para obtener la mejor relación señal/ruido posible, en un tiempo razonable, intentando minimizar la difusión de spin.

Los experimentos fueron realizados con supresión de la señal residual de HDO, utilizando la secuencia de pulsos “3-9-19 watergate” con gradientes y añadiendo a la secuencia de pulsos un filtro T1ρ. Todos los experimentos STD NMR se adquirieron con 2048 scans.

8.6. Estudios estructurales de los complejos de las glico-oligoamidas con polímeros de ADN.

Las disoluciones de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** se prepararon siguiendo el protocolo anteriormente explicado en el apartado 8.4.1 b). La concentración de los compuestos en el tubo de resonancia se determinó por ¹H-RMN, mediante la comparación de integrales respecto al patrón interno TSP-d4.

Las concentraciones de los polímeros de ADN (ct-DNA y poly(dAdT)₂) fueron calculadas por espectroscopia UV/Vis, usando los coeficientes de extinción molar descritos en la bibliografía para el ADN ($\epsilon^{262\text{nm}}$ poly(dAdT)₂ = 13200 M⁻¹ cm⁻¹ y $\epsilon^{260\text{nm}}$ ct-DNA = 12824 M⁻¹ cm⁻¹; concentración en pares de bases)^[1] como se indicó en el apartado 8.5.1.

Los disoluciones de ADN, ct-ADN (2 mg), poly(dA-dT)₂ (50UN), fueron calculadas como se explicó en el apartado 8.5.2 y preparadas según el protocolo descrito en el apartado 8.5.2.a).

El protocolo experimental, para ambos experimentos (TR-NOESY y STD) consistió en la adición de cantidades crecientes de una disolución de ADN (c~5 mM), en ausencia de ligando, a la disolución de glico-oligoamida tamponada. Se registró un espectro ¹H-RMN tras cada adición de ADN.

Los experimentos TR-NOESY y STD de las glico-oligoamidas (**1**, **2**, **7-9**) en presencia de ADN, (tanto con ct-ADN como con poly(dA-dT)₂), se realizaron en un punto tal que la relación ligando/ADN fue de 4/1 en todos los casos excepto para el complejo **6-desoxy-β-D-Man (9)**-ct-ADN que fue de 3/1.

En todos los casos, la muestra para los experimentos de nOe transferido (TR-NOESY) y de diferencia de transferencia de saturación (STD) para cada complejo glico-oligoamida-ADN fue la misma.

Los experimentos TR-NOESY y STD se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz). Los espectros de ¹H-RMN se realizaron según se describe en el apartado 8.5.

8.6.1. Experimentos de nOe transferido (TR-NOESY) de los complejos glico-oligoamida-ADN.

La puesta a punto del experimento TR-NOSEY se llevó a cabo con la glico-oligoamida **β-L-Man (7)** usando distintos tiempos de mezcla (τ_m = 50, 100, 200, 300 y 400 ms).³ Los mejores resultados, en términos de mayor relación señal/ruido y menor difusión de

³ El tiempo de mezcla (τ_m) es el tiempo que se emplea para transferir la magnetización a través de la relajación dipolar. Hay que tener en cuenta que el uso de tiempos de mezcla largos implica una mayor probabilidad de detección de nOes entre protones relativamente alejados, pero también favorecen la difusión de spin. La difusión de spin se produce por transferencia de magnetización entre dos spines alejados, pero que están próximos a otro o varios spines comunes, que actúan como intermediarios de la transferencia.

spín, se obtuvieron cuando se utilizó como tiempo de mezcla $\tau_m = 200$ ms. Así, dicho tiempo de mezcla se utilizó para todos los experimentos TR-NOESY de todos los complejos tanto con ct-ADN como con poly(dA-dT)₂.

Las concentraciones de los compuestos y los tiempos de mezcla utilizados en los experimentos TR-NOESY fueron las siguientes: con ct-ADN: **1** (c=800 μ M, τ_m =200 ms), **2** (c=300 μ M, τ_m =200 ms), **7** (c=300 μ M, τ_m =200 ms), **8** (c=300 μ M, τ_m =300 ms) y **9** (c=240 μ M, τ_m =200 ms); con poly(dA-dT)₂: **1** (c=220 μ M, τ_m =200 ms), **2** (c=250 μ M, τ_m =200 ms), **7** (c=300 μ M, τ_m =200 ms), **8** (c=500 μ M, τ_m =300 ms) y **9** (c=180 μ M, τ_m =200 ms).

Se encontraron nOes negativos (igual signo que la diagonal) e intensos en todos los experimentos de TR-NOESY (indicativos de que el ligando estaba unido a la macromolécula). En cambio, en los experimentos en el estado libre, se observaron nOes débilmente negativos para todas las glico-oligoamidas, típicos de moléculas de peso molecular intermedio.

8.6.2. Experimentos DF-STD de los complejos glico-oligoamida-ADN.

La muestra de RMN se preparó del mismo modo que para los experimentos TR-NOESY. Las relaciones molares utilizadas, (Ligando/ct-ADN) fueron las mismas que las empleadas en los experimentos TR-NOESY.

Para describir la región de interacción del ADN con el ligando, se seleccionaron dos frecuencias de saturación (on-resonance) diferentes: 4.5 ppm (correspondiente a la región espectral de los protones H4', H5' y H5'' de las desoxirribosas del ADN) y 5.6 ppm (correspondiente a la región de los protones H1' de las desoxirribosas). Así, la irradiación a 4.5 ppm se corresponde con la región exterior del surco menor del ADN y la irradiación a 5.6 ppm se corresponde con la región interna del surco.

La frecuencia de saturación off-resonance seleccionada fue de 100 ppm.

Los experimentos control consistieron en registrar los espectros STD de los compuestos **1, 2, 7-9** en ausencia de ADN. Para todos los compuestos (**1, 2, 7-9**) se realizaron los correspondientes experimentos control⁴ a las dos frecuencias de irradiación seleccionadas

⁴ Ver figuras 9.19 y 9.20 del anexo.

on-resonance (4.5 y 5.6 ppm) de la misma forma que se explicó en el apartado 8.5.5 para comprobar que no había efectos de saturación indirecta sobre los protones del ligando en ausencia de ADN.

Los experimentos control de STD, confirmaron que los ligandos estudiados, en general, recibían una saturación menor del 5% al irradiar en la zona de las resonancias de los protones tanto a H1' (5.6 ppm) en ausencia de ADN.

En algunos casos, al irradiar a la frecuencia de 4.5 ppm se encontró que los protones del centro anomérico del carbohidrato y los grupos metilo (Me^A y Me^B) de las glico-oligoamidas recibían una saturación por encima del 5%.

En todos los casos, habiendo recibido menos de un 5% de saturación o más, para el cálculo de las intensidades %I_{STD} se procedió a restar el %I del experimento control en ausencia de ADN.

Los efectos STD en los protones individuales de cada compuesto (variación en la intensidad de su resonancia) se calcularon en relación al espectro de referencia que se hizo irradiando a 100 ppm (off-resonance), con 1024 acumulaciones.

$$I_{STD} = I_{off} - I_{on}$$

$$\%I_{STD} = 100 \cdot \frac{I_{STD}}{I_{off}} = 100 \cdot \frac{(I_{off} - I_{on})}{I_{off}}$$

$$\%I_{STD \text{ norm}} = 100 \cdot \frac{\%I_{STD}}{\%I_{STD \text{ del proton Py-3}^A}}$$

Ecuación 7.2

Para analizar los resultados del experimento, se calcularon las intensidades relativas de %I_{STD} de las resonancias de los protones. (Ver ecuación 7.2). Los valores de %I_{STD} se calcularon con el programa Mestrenova (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, Spain) a partir de la FID ya procesada. Para cada uno de los ligandos se determinó cuantitativamente el mapa del epítipo calculando los porcentajes de %I_{STD} normalizados (%I_{STD NORM}) respecto al valor máximo de %I_{STD}, (tablas 9.13 y 9.14 del anexo) para el que, arbitrariamente, se le dio un valor de 100 %. En todos los casos se normalizó al valor máximo

de %I_{STD} correspondiente a las resonancias de los protones Py-3^A que generalmente resultó ser el de valor máximo de %I_{STD} a las dos frecuencias de irradiación. Así, se asumió que el protón observado estaría más próximo a la región irradiada del ADN cuando el espectro correspondiente mostrase una mayor intensidad normalizada.

A continuación se determinó el cociente entre los valores de %I_{STD} normalizados irradiando en la región exterior (I_f) e interior (I_d) del ADN.

Así, el valor de I_f/I_d se calculó a partir de los valores de %I_{STD} normalizados (%I_{STD-Norm}) como el cociente entre la intensidad de STD normalizada al irradiar en la zona externa del surco menor del ADN (a 4.5 ppm) y la zona interna del surco menor del ADN (a 5.6 ppm). (Ecuación 7.1).

$$\frac{I_f}{I_d} = \frac{\% I_{STD - Norm, 4.5}}{\% I_{STD - Norm, 5.6}}$$

Ecuación 7.1

Se estimó, considerando a toda la molécula de glico-oligoamida de forma global, que las resonancias de los protones con valores de I_f/I_d menores o iguales a 1.1 se corresponden con resonancias más cercanas al interior del surco menor del ADN y valores mayores a 1.1 indican cercanía al exterior del surco menor del ADN. Los valores del cociente I_f/I_d para las resonancias de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** en los complejos con ct-ADN y con poly(dA-dT)₂ se muestran en las tablas 9.15 y 9.16 del anexo respectivamente.

Tras valorar los ligandos de forma global para el cálculo de la relación I_f/I_d, se procedió a analizar los valores de I_f/I_d del carbohidrato exclusivamente. Se estimó que aunque en general todas las resonancias presentaron valores por encima de 1.1, los valores más cercanos a 1.1 correspondían a resonancias más cercanas al interior del surco menor del ADN, y para valores muy por encima de 1.1 correspondían a resonancias más alejadas del surco menor del ADN.

8.7. Determinación de las constantes de asociación: Valoraciones de las glico-oligoamidas β -D-Man (1), β -D-Tal (2), β -D-Glc (3), β -D-Gal (4), β -L-Man (7), β -L-Gal (8) y 6-desoxy- β -D-Man (9) con poly(dA-dT)₂ por ¹H-RMN.

El protocolo utilizado para la cuantificación de las constantes de asociación de las glico-oligoamidas en su interacción con poly(dA-dT)₂ está basado en el método utilizado para la estimación de afinidades proteína-Ligando anteriormente descrito.^[3]

Este método correlaciona el cociente de intensidades de pico (I_{obs}/I_0) de ¹H-RMN del ligando, en presencia (I_{obs}) y en ausencia de macromolécula (I_0), con la fracción de ligando complejoado (f_B). Así, cuando un ligando se une a una macromolécula, el ligando adopta las propiedades de relajación de la macromolécula de forma que se produce un aumento de la anchura de línea de las resonancias del ligando y una disminución de la intensidad de la señal.

Así, se llevaron a cabo una serie de valoraciones de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas **1-4**, **7-9** con poly(dAdT)₂ en tampón fosfato. El protocolo de las valoraciones por ¹H-RMN se ha descrito en el apartado 8.5.4.

A partir de los espectros de las valoraciones por ¹H-RMN se calculó el valor de las intensidades relativas de las resonancias de los protones (Ind-3, Py-5^A, Py-5^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B) de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9**. Las intensidades de las resonancias del ligando en ausencia de ADN se normalizaron al valor de 1.00. La intensidad relativa (I_{obs}/I_0) de las resonancias de ¹H-RMN de los protones tras cada adición de ADN se calcularon con respecto a la intensidad de las resonancias de los protones del ligando en ausencia de ADN (I_0). Las intensidades relativas de las resonancias de los protones se calcularon con el programa Mestrenova (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, Spain) a partir de la FID ya procesada.

A continuación, se representan la disminución de la intensidad relativa (I_{obs}/I_0) de las diferentes resonancias (Ind-3, Py-5^A, Py-5^A, Py-5^B, Py-3^B, Me^A y Me^B) de las glico-oligoamidas **1-4**, **7-9** frente a la concentración de poly(dAdT)₂. Los datos experimentales de esta representación muestran una isoterma de unión, cuyos valores se ajustaron a la curva definida en la Ecuación 7.2⁵ mediante regresión no lineal. El ajuste de las curvas anteriores se

⁵ La deducción de la Ecuación 7.1 aparece en el anexo de esta Tesis Doctoral (ver deducción de Ecuación A. 13 en el Anexo). Es de destacar que el ajuste de los datos experimentales de las valoraciones por ¹H-RMN tanto utilizando la ecuación propuesta por Shortridge et al.^[3] como la ecuación 7.1 (ver Ecuación

realizó utilizando el programa Microcal Origin 6.0 manteniendo fijo el parámetro c para cada tipo de protón y dejando como parámetro ajustable K_D . De esta forma, se obtiene una estimación de la constante de equilibrio de disociación (K_D).

$$\frac{I_{obs}}{I_0} = \frac{1}{1 + \frac{c \cdot [P]_T}{[P]_T + K_D}}$$

Ecuación 7.2

La Ecuación 7.2 está expresada en términos de la concentración total de macromolécula añadida $[P]_T$. I_{obs} y I_0 representan las intensidades de las resonancias del ligando en presencia y en ausencia de ADN respectivamente. El parámetro adimensional “ c ” se define como $c = (v_B / v_F - 1)$, donde v_F y v_B corresponden con la anchura de línea de las resonancias del ligando en el estado libre y asociado respectivamente. El cociente de anchura de líneas (c) representa el cambio proporcional en la anchura de línea del ligando cuando se está uniendo a la macromolécula y actúa como un factor de escala en el cálculo de la constante de disociación (K_D). La Ecuación 7.2 se presenta como ecuación alternativa a la propuesta por Shortridge et al para realizar el ajuste de los datos de las valoraciones y se deriva de un modelo de interacción para un complejo de estequiometría 1:1.

Debido a la completa covarianza entre c y K_D , se requiere una estimación del valor del parámetro “ c ” para calcular la constante de disociación a partir de estas curvas de valoración por ^1H -RMN.

Los valores de K_D se han obtenido por regresión no lineal de los datos experimentales utilizando la Ecuación 7.2 En el ajuste de los datos se ha manteniendo fijo el parámetro “ c ” para cada tipo de protón y se ha dejado como parámetros ajustables K_D y n .

El ajuste se ha realizado para los diferentes compuestos utilizando el mismo valor del parámetro de anchura de línea (c) para cada tipo de protón, bajo la asunción de que el modo de unión de los distintos compuestos es semejante y por tanto, independientemente del compuesto, los espines de los protones equivalentes sufrirán la misma perturbación por efecto

A. 13 en el anexo) dan lugar a resultados de K_D análogos, por lo tanto ambos ajustes resultaron igual de válidos

de la interacción con el DNA en la forma unida. En la Tabla 7.1, se detallan los valores de concentración total de ligando y del parámetro (c) utilizados en su cálculo.

Teniendo en cuenta que en ningún caso se ha podido llegar a la condición de saturación necesaria para determinar el valor máximo de ensanchamiento de línea, no ha sido posible definir independientemente el valor del parámetro “c”. Como aproximación, se ha tomado como valor el límite inferior del ensanchamiento de línea máximo que se puede calcular a partir de la relación de intensidades (I_{obs}/I_0) mínima observable para cada tipo de protón entre las valoraciones de todos los compuestos. Así el valor del parámetro “c” utilizado, para cada tipo de protón, corresponde a un valor igual o superior al calculado a partir de la relación de intensidades (I_{obs}/I_0) para las concentraciones de ADN máximas utilizadas durante las valoraciones de todos los compuestos.

Tabla 7.1. Valores de K_D obtenidos en el ajuste de los datos, para las diferentes resonancias (Ind-3, Py-5A, Py-5B, Py-3B, MeA y MeB) de las glico-oligoamidas **1**, **2**, **7-9** en su interacción con poly(dAdT)₂

Tipo de protón	c	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)	β -L-Man (7)	β -L-Gal (8)	6-desoxy- β -D-Man (9)
Ind-3	40	3.2	7.0	1.6	3.6	1.2	2.4	6.6
Py-5 ^A	25	2.7	7.2	1.0	2.3	1.3	1.6	7.0
Py-3 ^A	22	2.5	5.6	0.6	1.4	1.3	0.9	11.2
Py-5 ^B	13	1.3	3.9	0.6	1.1	0.2	1.0	3.2
Py-3 ^B	10	3.2	5.6	0.6	1.1	0.9	1.4	4.1
Me ^A	55	2.9	5.6	0.9	3.3	0.7	1.5	5.7
Me ^B	30	3.0	6.7	1.1	5.6	0.3	2.4	7.2
K_D promedio (mM) ^{a,b}		2.7±0.2	5.9±0.3	0.9±0.04	2.6±0.1	0.85±0.1	1.6±0.1	6.4±1.1
[Ligando] total (μM)		250	90	100	150	100	190	170

a) La concentración de la constante de asociación K_D está expresada en mM pares de bases (bp).

b) Los errores fueron calculados como al desviación estándar de los diferentes valores de K_D obtenidos para cada protón.

Los valores de constantes de asociación (K_a) calculados que aparecen en la Tabla 7.2 son la media aritmética de todos los valores medidos para las diferentes resonancias. Estos valores nos permiten establecer un orden de afinidades relativas.

Tabla 7.2. Valores de K_a obtenidos en el ajuste de los datos, para las glico-oligoamidas **1-4**, **7-9** en su interacción con poly(dAdT)₂.

Tipo de protón	β -D-Man (1)	β -D-Tal (2)	β -D-Glc (3)	β -D-Gal (4)	β -L-Man (7)	β -L-Gal (8)	6-desoxy- β -D-Man (9)
K_a promedio (mM) ^{a,b}	373 \pm 33	168 \pm 3	1098 \pm 45	384 \pm 20	1176 \pm 124	637 \pm 36	156 \pm 25
[Ligando]] total (μ M)	250	90	100	150	100	190	170

8.7.1. Experimentos de competición entre dos ligandos con poly(dA-dT)₂.

Los experimentos de competición consistieron en registrar un primer espectro de ¹H-RMN de la disolución tamponada que contiene los dos ligandos en la misma concentración (en un rango de 100-150 μ M). A continuación se añadieron cantidades crecientes de una disolución de poly(dA-dT)₂ (5-6 mM (bp)) registrando un espectro ¹H-RMN tras cada adición de ADN. Se registraron normalmente 2 o 3 espectros en presencia de ADN. Así, las resonancias del compuesto que tiene una mayor afinidad se ensacharon antes disminuyendo su intensidad más rápidamente que en el caso de los compuestos con menor afinidad.

Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un equipo Bruker Avance (500 MHz) a 25°C siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.5.

8.8. Referencias

- [1] Ragazzon, P.; Ragazzon, N. C.; Garbett, J.; Chaires, P. *Methods* **2007**, *42*, 173-182.
- [2] (a) Souard, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, Juan L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435-2442; (b) Mayer, M.; Mayer, B.; Meyer, M.; Mayer *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117.
- [3] Shortridge, M.; Shortridge, D. S.; Hage, G.; Harbison, R.; Powers, M. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 948-958.

9. ANEXO.

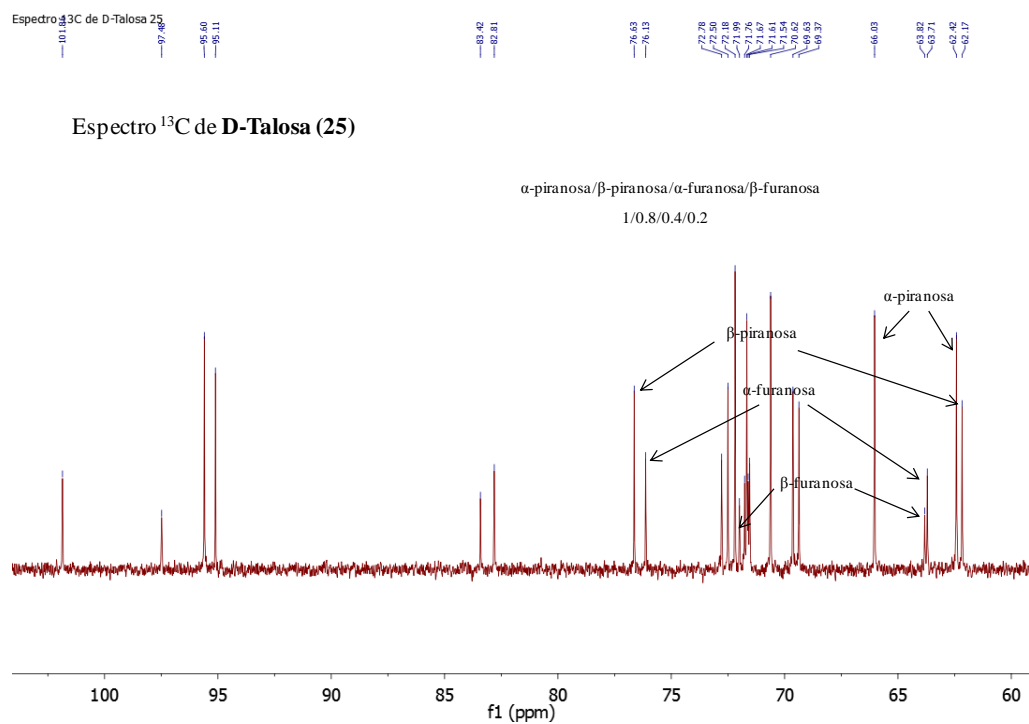


Figura 9.1. Espectro de ^{13}C de **D-Talosa (25)** en D_2O a 25 °C y 500MHz.

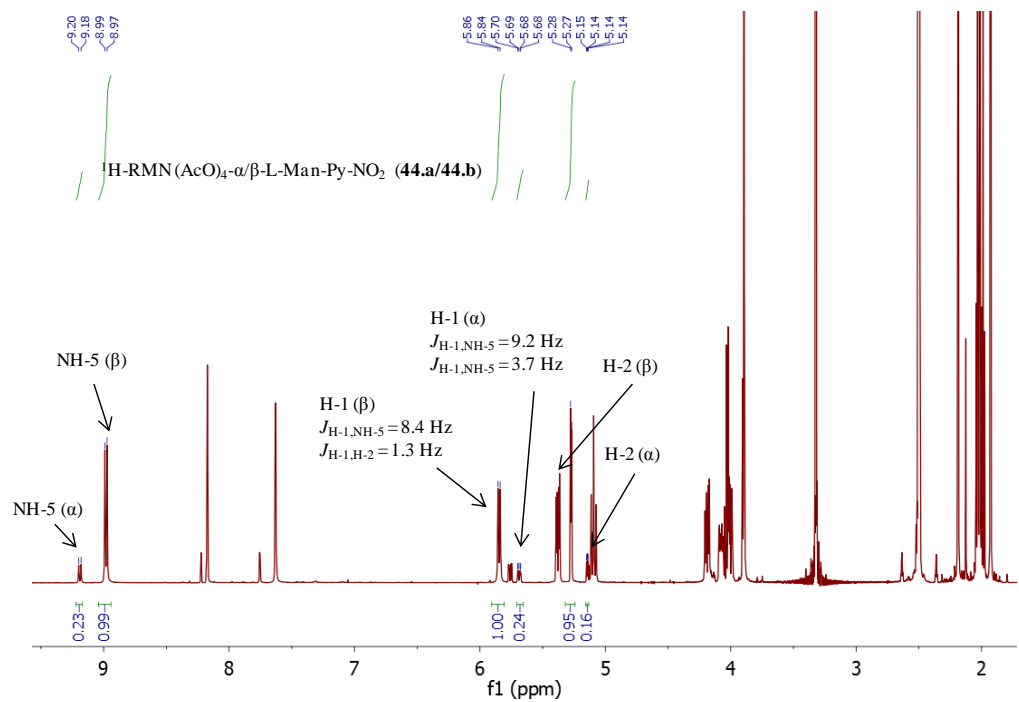


Figura 9.2. Espectro de ^1H -RMN de la mezcla de anómeros α y β $(\text{AcO})_4\text{-}\beta\text{-L-Man-Py-NO}_2$ (44.a/44.b).

Tabla 9.1. Desplazamientos químicos δ de los protones intercambiables de $\beta\text{-D-Man}$ (1) a diferentes temperaturas.

	NH-1	NH-2	NH-3	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
T (K)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
258	10.975	9.969	7.712	9.711	7.369	5.934	5.817	5.986	5.731
263	10.954	9.956	7.690	9.693	7.367	5.910	5.789	5.954	5.700
268	10.924	9.939	7.663	9.667	7.366	5.875	5.739	5.908	5.639
273	10.894	9.921	7.633	9.641	7.367	5.850	5.691	5.850	5.581

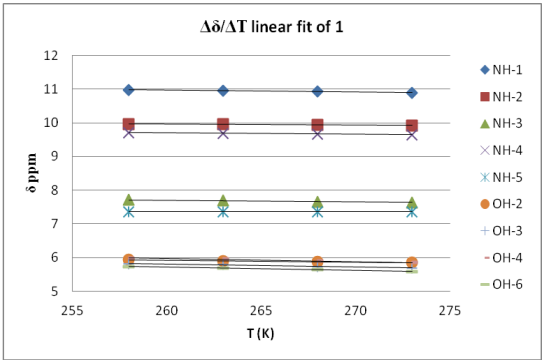
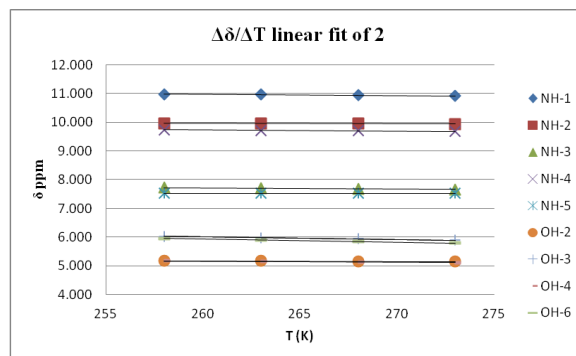


Figura 9.3. Ajuste lineal de los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de $\beta\text{-D-Man}$ (1).

Tabla 9.2. Desplazamientos químicos δ de los protones intercambiables de β -D-Tal (2) a diferentes temperatura

	NH-1	NH-2	NH-3	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
T (K)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
258	10.984	9.957	7.724	9.744	7.523	5.168	6.028	5.173	5.947
263	10.962	9.953	7.703	9.721	7.521	5.165	5.978	5.148	5.890
268	10.941	9.945	7.680	9.701	7.519	5.153	5.932	5.126	5.844
273	10.922	9.936	7.659	9.681	7.518	5.148	5.886	5.104	5.792

**Figura 9.4.** Ajuste lineal de los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de β -D-Tal (2).**Tabla 9.3.** Desplazamientos químicos δ de los protones intercambiables de β -D-Glc (3) a diferentes temperaturas.

	NH-1	NH-2	NH-3	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
T (K)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
258	11.044	10.180	7.902	9.889	8.560	6.454	6.400	6.614	5.943
263	11.031	10.172	7.889	9.867	8.541	6.420	6.364	6.569	5.897
268	11.016	10.160	7.872	9.841	8.516	6.377	6.313	6.514	5.846
273	10.999	10.146	7.854	9.815	8.491	6.343	6.273	6.465	5.789

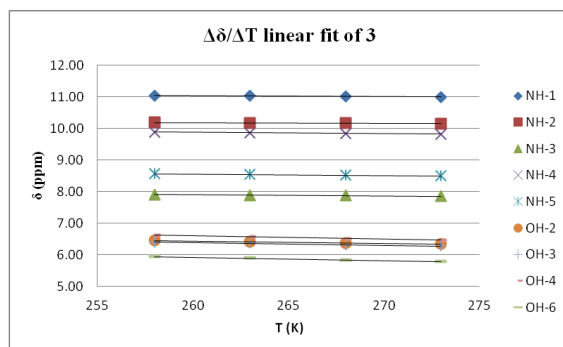


Figura 9.5. Ajuste lineal de los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de β -D-Glc (3).

Tabla 9.4. Desplazamientos químicos δ de los protones intercambiables de β -D-Gal (4) a diferentes temperaturas.

	NH-1	NH-2	NH-3	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4/OH-6
T (K)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
258	11.019	10.16	7.885	9.894	8.632	6.322	6.244	6.065
263	11.008	10.152	7.873	9.869	8.609	6.285	6.200	6.015
268	10.994	10.142	7.858	9.844	8.584	6.244	6.154	5.963
273	10.977	10.129	7.842	9.816	8.556	6.198	6.106	5.903

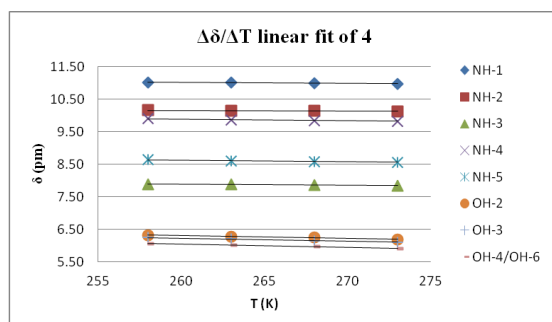


Figura 9.6. Ajuste lineal de los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de β -D-Gal (4).

Tabla 9.5. Desplazamientos químicos δ de los protones intercambiables de β -D-Man-Py-NHAc (5) a diferentes temperaturas

	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
T (K)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
258	10.01	8.18	6.36	6.36	6.41	6.02
263	9.98	8.15	6.31	6.31	6.35	5.97
268	9.94	8.13	6.26	6.26	6.29	5.90
273	9.90	8.09	6.21	6.21	6.22	5.84

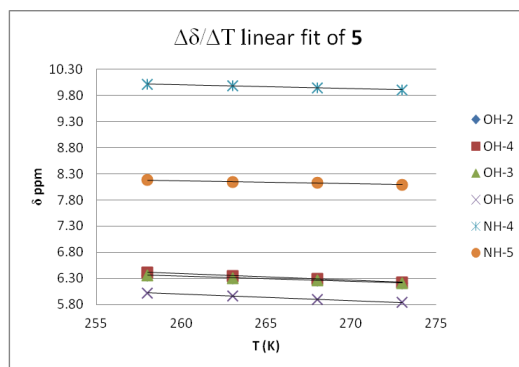


Figura 9.7. Ajuste lineal de los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de β -D-Man-Py-NHAc (5).

Tabla 9.6. Desplazamientos químicos δ de los protones intercambiables de β -D-Tal-Py-NHAc (6) a diferentes temperaturas.

	NH-4	NH-5	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
T (K)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
258	10.011	8.247	5.542	5.474	6.461	6.139
263	9.968	8.210	5.473	5.404	6.390	6.065
268	9.925	8.174	5.402	5.332	6.333	5.981
273	9.881	8.138	5.314	5.251	6.233	5.874

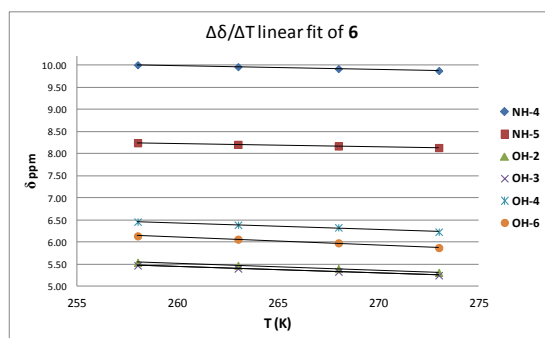


Figura 9.8. Ajuste lineal de los coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de β -D-Tal-Py-NHAc (6).

Descripción de los métodos computacionales de Mecánica Molecular (MM), Dinámica Molecular (DM) y cálculos *ab initio*.

Mecánica Molecular. Los métodos de Mecánica Molecular se basan en las leyes de la mecánica clásica y usan como modelos (considerados como masas puntuales con carga) unidos por

enlaces. Usando parámetros como constantes de fuerza de alargamiento del enlace y la introducción de términos que permiten considerar interacciones entre los átomos no enlazados, el método construye una expresión para la energía potencial, que es función de las posiciones atómicas. Mediante la minimización de esta función para los distintos conformeros, los métodos de MM predicen geometrías en el equilibrio y energías relativas. Debido a que son mucho más rápidos que los cálculos de mecánica cuántica, al estar parametrizados, pueden tratar sistemas de un número elevado de átomos y, de hecho, en la actualidad se han desarrollado muchas aplicaciones al estudio de biomoléculas.

En los métodos de MM se analizan las contribuciones a la energía potencial de las moléculas debidas a: alargamiento de enlace $V^{(alar)}$, deformación del ángulo de enlace $V^{(def)}$, deformación fuera del plano $V^{(oop)}$, rotación interna alrededor de un enlace (torsión) $V^{(tor)}$, interacciones entre estas clases de movimientos (término cruzado), $V^{(cruz)}$, atracciones y repulsiones de van der Waals entre átomos no enlazados $V^{(vdw)}$ e interacciones electrostáticas entre los átomos $V^{(elec)}$.

Las expresiones explícitas para cada término de la ecuación definen lo que se denomina campo de fuerzas en MM. Las derivadas de la energía potencial determinan las fuerzas que actúan sobre cada átomo.

Los diferentes campos de fuerza utilizan conjuntos de parámetros ajustables, fundamentalmente constantes de fuerza, datos atómicos, valores estructurales de geometrías en equilibrio para que las calculadas se acerquen lo más posible a las experimentales. La MM supone que estos parámetros y constantes de fuerza son transferibles de una molécula a otra; es decir que son los mismos en cualquier ambiente. Para que un campo de fuerzas sea útil y proporcione resultados fiables es necesario que estos parámetros sean realmente transferibles de una molécula a otra. Existen numerosos campos de fuerza descritos en la literatura que se han desarrollado para ser aplicados específicamente al estudio estructural de diferentes tipos de moléculas. Por ejemplo, los campos de fuerzas más frecuentemente usados en el análisis conformacional de carbohidratos son AMBER y MM3.

En el caso de moléculas flexibles y, como particularmente, de los carbohidratos, los cálculos de MM conllevan el problema de la existencia de mínimos múltiples y en principio no es posible determinar si la estructura obtenida corresponde con el mínimo global o sí, por el contrario, representa un mínimo local. Según esto, el resultado final, depende de la elección de la

estructura de partida. Este problema puede solucionarse realizando una búsqueda conformacional lo más extensa posible mediante métodos sistemáticos o estocásticos.

Dinámica Molecular. La DM es una técnica de simulación que resuelve las ecuaciones clásicas del movimiento, (ecuaciones de Newton), a nivel atómico. Hay que asumir la disponibilidad de un potencial preciso, (y generalmente empírico), que describa las interacciones entre los átomos. Así, en simulaciones de DM, el movimiento se divide en pasos de tiempo muy cortos.

Los métodos de DM resuelven las ecuaciones de Newton para el movimiento de los átomos en una superficie de energía. La energía total de una molécula está distribuida entre energía potencial y energía cinética, y las moléculas son capaces de superar las barreras que separan los mínimos si el valor de la barrera energética es menor que la energía total menos la energía potencial. Si la energía es lo suficientemente grande, lo que puede ajustarse con la temperatura de simulación, los cálculos de DM pueden hacer un muestreo de la hipersuperficie completa, aunque para esto se requiere un tiempo de simulación impracticablemente elevado. Debido a que se requieren tiempos pequeños a la hora de integrar las ecuaciones de Newton, los tiempos de simulación son cortos (nanosegundos, en casos excepcionales de microsegundos). Este hecho, combinado con el uso de temperaturas razonables, hace que sólo se haga un muestreo del área local en torno al punto de inicio, y que sólo se superen barreras de energía de unas pocas kcal/mol. Pueden obtenerse otros mínimos locales seleccionando geometrías a intervalos adecuados durante la simulación y minimizando estas estructuras.⁽¹⁾

Los métodos de DM genera una serie de puntos correlacionados temporalmente en el espacio de fase, una trayectoria, propagando un conjunto inicial de coordenadas y velocidades, según la segunda ley de Newton, mediante una serie de pasos de tiempo finito. Para producir una muestra representativa, una condición necesaria (aunque no suficiente) es que el sistema se equilibra, efectuando unos cálculos iniciales y, a continuación, se realiza ya la simulación propiamente dicha. El conjunto completo de puntos que se obtiene en la simulación se divide en bloques con una longitud que es lo suficientemente larga para hacer puntos equivalente en dos bloques vecinos no correlacionados. En los métodos de DM, la distancia entre bloques (no correlacionados), tiene dimensión de tiempo y se denomina tiempo de correlación. Cabe destacar que las distintas propiedades conformacionales de la molécula pueden tener tiempos de correlación diferentes, y esto puede requerir una forma diferente de hacer el muestreo del conjunto completo de puntos. En el caso de la DM, el tiempo aparece de forma explícita, y por tanto, es un método adecuado para hacer simulaciones de propiedades dependientes del tiempo,

como las funciones de correlación, y para calcular propiedades que dependan de las velocidades de las partículas.⁽¹⁾

Cálculos *ab initio*. Se da este nombre a las computaciones derivadas directamente de principios teóricos, tales como la ecuación de Shrödinger, sin incluir información experimental.

El tipo más común de cálculo “*ab initio*” es llamado cálculo Hartree Fock (HF), en el cual la aproximación principal es llamada aproximación de campo central. Este método no incluye las repulsiones Coulómbicas electrón-electrón en el cálculo. Sin embargo, su efecto neto está incluido en el cálculo.

Debido a la aproximación de campo central, las energías de los cálculos HF son siempre más grandes que la energía exacta y tienden a un valor límite llamado límite Hartree-Fock. La segunda aproximación en los cálculos HF es que la función de onda debe ser descrita por una forma funcional, la cual sólo es conocida exactamente para unos cuantos sistemas electrónicos. Las funciones usadas más a menudo son las combinaciones lineales de orbitales tipo Slater y orbitales tipo Gaussian, abreviados STO y GTO respectivamente. La función de onda está constituida de combinaciones lineales de orbitales atómicos, o más a menudo de combinaciones lineales de funciones base.

La mayoría de los cálculos *ab initio* comienza con un cálculo HF, seguido de correcciones posteriores para la repulsión electrón-electrón explícita, denominadas correlaciones. Algunos métodos son la teoría perturbacional Möller-Plesset, el método generalizado de enlace de valencia (GVB) y Multiconfigurations self consistent field (MSCF) entre otros. Como un conjunto estos métodos se denominan cálculos correlacionados.

Un método “*ab initio*” alternativo es la Teoría de funcional de la Densidad (DFT), en el cual la energía total se expresa en términos de la densidad electrónica total, en vez de usar la función de onda. En este tipo de cálculos, hay un Hamiltoniano aproximado y una expresión aproximada de la densidad electrónica total.

El aspecto favorable de los métodos *ab initio* es que eventualmente convergen en la solución exacta, una vez que todas las aproximaciones se han hecho suficientemente pequeñas de magnitud. El aspecto desfavorable de los métodos *ab initio* es que llevan bastante tiempo.

Tabla 9.8. Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones aromáticos y del residuo de ácido γ -aminobutírico en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en H_2O con capilar externo de D_2O a 5°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-L-Man (7)}$	$\beta\text{-L-Gal (8)}$	6-desoxy-$\beta\text{-D-Man (9)}$
Concentración		900 μM	300 μM	300 μM	250 μM	650 μM
Indol	In-3	7.07 (s)	7.14 (s)	7.18 (s)	7.21 (s)	7.13 (s)
	In-4	7.78 (d, $J = 7.5$)	7.80 (d, $J = 8.7$)	7.83 (d, $J = 8.6$)	7.77 – 7.82 (m)	7.78 (d, $J = 9.0$)
	In-5	7.24 (t, $J = 4.0$)	7.24 (t, $J = 7.8$)	7.27 (t, $J = 7.8$)	7.21 – 7.24 (m)	7.26 (t, $J = 7.70$)
	In-6	7.38 (t, $J = 5.5$)	7.39 (t, $J = 7.6$)	7.42 (t, $J = 7.6$)	7.39 (t, $J = 7.9$)	7.39 - 7.42 (m)
	In-7	7.57 (d, $J = 7.2$)	7.57 – 7.68 (m)	7.62 (t, $J = 8.4$)	7.60 (d, $J = 8.5$)	7.60 (d, $J = 8.40$)
Pirroles	Py-3^A	6.46 (s)	6.52 (s)	6.54 (s)	6.52 (s)	6.51 (s)
	Py-3^B	6.69 (sa)	6.72 (s)	6.72 (s)	6.70 (s)	6.71 (sa)
	Py-5^A	6.93 (s)	7.00 (s)	7.00 (s)	7.12 (s)	6.98 (s)
	Py-5^B	6.69 (sa)	6.75 (s)	6.74 (s)	6.85 (s)	6.71 (sa)
	Me^A	3.65 - 3.76 (m)	3.76 (s)	3.78 (s)	3.75 (s)	3.76 (s)
	Me^B	3.65 - 3.76 (m)	3.60 - 3.68 (m)	3.69 (sa)	3.58 (s)	3.68 (sa)
Cadena γ	γa	3.16 (m)	3.17 - 3.21 (m)	3.17-3.22 (m)	3.40-3.53 (m)	3.16-3.20 (m)
	$\gamma\text{a}'$	3.65 - 3.76 (m)	3.60 - 3.68 (m)	3.69 (sa)	3.40-3.53 (m)	3.68 (sa)
	γb	1.97 (sa)	1.92 - 2.03 (m)	1.97 - 2.02 (m)	2.02 – 2.07 (m)	1.97 - 2.01 (m)
	$\gamma\text{b}'$	2.10 (sa)	2.09 - 2.21 (m)	2.12 - 2.18 (m)		2.11 - 2.15
	γc	2.37 (sa)	2.37 - 2.41 (m)	2.37 - 2.43 (m)	2.42 (t, $J = 6.2$)	2.38 - 2.40 (m)

Tabla 9.9. Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones del carbohidrato en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en H_2O con capilar externo de D_2O a 5°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-L-Man (7)}$	$\beta\text{-L-Gal (8)}$	6-desoxy-$\beta\text{-D-Man (9)}$
Concentración		900 μM	300 μM	300 μM	250 μM	650 μM
Carbohidrato	H-1	4.02 (d, $J = 8.9$)	3.95 (d, $J = 8.8$)	4.03 (d, $J = 8.8$)	4.62 (m)	3.96 (d, $J = 8.9$)
	H-2	3.07 (sa)	3.00 (sa)	3.07 (sa)	3.67 – 3.68 (m)	3.06 (sa)
	H-3	2.27 (m)	2.29 (sa)	2.27 (d, $J = 10.8$)	3.52 – 3.54 (m)	2.18 - 2.23 (m)
	H-4	3.32 (t, $J = 10.4$)	3.55 (sa)	3.33 (t, $J = 8.7$)	3.89 (m)	3.09 (t, $J = 10.2$)
	H-5	2.91 (m)	3.12 - 3.16 (sa)	2.90 - 2.94 (m)	3.47 – 3.49 (m)	2.88 - 2.92 (m)
	H-6	3.56 (ddd, $J = 12.5, 6.3$)	3.60 – 3.68 (m)	3.54 - 3.58 (m)	3.67 – 3.68 (m)	-
	H-6'	3.65 - 3.76 (m)		3.75 (m)		-

Tabla 9.10. Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones NHs en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en H_2O con capilar externo de D_2O a 5°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm). Los grupos hidroxilo no pudieron ser detectados a la temperatura de 5°C

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-L-Man (7)}$	$\beta\text{-L-Gal (8)}$	6-desoxy-$\beta\text{-D-Man (9)}$
Concentración		900 μM	300 μM	300 μM	250 μM	900 μM
Protones NH	NH-1	10.90 (s)	11.99 (s)	11.00 (s)	11.93 (s)	10.98 (s)
	NH-2	9.86 (s)	9.98 (s)	9.99 (s)	10.04 (s)	9.87 (s)
	NH-3	7.65 (s)	7.74 (m)	7.74 (sa)	7.77 – 7.83 (m)	7.72 (m)
	NH-4	9.70 (s)	9.73 (s)	9.74 (s)	9.75 (s)	9.72 (s)
	NH-5	7.46 (d, $J = 8.8$)	7.57 - 7.62 (m)	7.48 (d, $J = 8.9$)	8.49 (d, $J = 9.1$)	7.39 – 7.42 (m)

Tabla 9.11. Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones aromáticos y del residuo de ácido γ -aminobutírico en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en D_2O 25°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm)

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-L-Man (7)}$	$\beta\text{-L-Gal (8)}$	6-desoxy-$\beta\text{-D-Man (9)}$
Concentración		800 μM	800 μM	300 μM	250 μM	400 μM
Indol	In-3	7.13 (s)	7.12 (s)	7.18 (s)	7.23 (s)	7.16 (s)
	In-4	7.80 (d, $J = 8.5$)	7.79 (d, $J = 7.7$)	7.83 (d, $J = 8.60$)	7.81 (d, $J = 8.2$)	7.83 (d, $J = 8.05$)
	In-5	7.26 (t, $J = 7.5$)	7.23 (t, $J = 6.0$)	7.28 (t, $J = 7.80$)	7.23 – 7.25 (m)	7.28 (t, $J = 7.5$)
	In-6	7.40 (t, $J = 7.5$)	7.39 (t, $J = 5.0$)	7.43 (t, $J = 7.90$)	7.38 – 7.41 (m)	7.40 (t, $J = 7.0$)
	In-7	7.61 (t, $J = 8.5$)	7.60 (d, $J = 8.4$)	7.64 (d, $J = 8.60$)	7.61 (d, $J = 8.2$)	7.64 (d, $J = 8.4$)
Pirroles	Py-3^A	6.52 (s)	6.51 (s)	6.56 (s)	6.57 (d, $J = 1.8$)	6.54 (d, $J = 1.8$)
	Py-3^B	6.69 (s)	6.71 (s)	6.72 (s)	6.72 (d, $J = 1.9$)	6.72 (d, $J = 1.8$)
	Py-5^A	7.00 (s)	7.00 (s)	7.05 (s)	7.14 (d, $J = 1.5$)	7.03 (d, $J = 1.6$)
	Py-5^B	6.75 (s)	6.76 (s)	6.77 (s)	6.88 (d, $J = 1.5$)	6.77 (d, $J = 1.5$)
	Me^A	3.75 (sa)	3.73 (s)	3.79 (s)	3.76 (s)	3.78 (s)
	Me^B	3.67 (s)	3.67 (s)	3.69 (sa)	3.61 (s)	3.70 (s)
Cadena γ	γa	3.21 (m)	3.19 - 3.22 (m)	3.69 (sa)	3.28 – 3.34 (m)	3.24 - 3.29 (m)
	$\gamma\text{a}'$	3.54 - 3.57 (m)	3.63 - 3.65 (m)	3.25 (ddd, $J = 13.6, 8.3, 3.7$)	3.49 – 3.51 (m)	3.63 - 3.69 (m)
	γb	1.98 - 2.01 (sa)	1.98 (sa)	1.97 - 2.05 (sa)	2.02 – 2.08 (m)	1.98 - 2.07 (m)
	$\gamma\text{b}'$	2.08 - 2.11 (sa)	2.10 (sa)	2.12 - 2.16 (sa)		2.09 - 2.16 (m)
	γc	2.36 (sa)	2.39 (sa)	2.40 - 2.43 (m)	2.43 (t, $J = 6.3$)	2.40 - 2.45 (m)

Tabla 9.12. Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) de las resonancias de los protones del carbohidrato en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas **1-2** y **7-9** en D_2O a 25 °C. Referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

		$\beta\text{-D-Man (1)}$	$\beta\text{-D-Tal (2)}$	$\beta\text{-L-Man (7)}$	$\beta\text{-L-Gal (8)}$	6-desoxy- $\beta\text{-D-Man (9)}$
Concentracion		10^{-4} M	10^{-4} M	3×10^{-4} M	250 μM	4×10^{-4} M
Carbohidrato	H-1	4.22 (s)	4.14 (sa)	4.23 (s)	4.62 (m)	4.17 (s)
	H-2	3.18 - 3.22 (m)	3.13 (sa)	2.52 (dd, $J = 10.3, 3.0$)	3.67 - 3.68 (m)	3.23 (d, $J = 2.9$)
	H-3	2.53 (d, $J = 9.8$)	2.58 (sa)	2.98 - 3.01 (m)	3.52 - 3.54 (m)	2.5 (dd, $J = 9.7, 3.1$)
	H-4	3.37 (t, $J = 8.9$)	3.61 (sa)	3.38 (t, $J = 9.4$)	3.89 (m)	3.17 (t, $J = 9.6$)
	H-5	2.95 - 3.00 (m)	3.19 - 3.22 (m)	2.98 - 3.01 (m)	3.47 - 3.49 (m)	3.01 (dq, $J = 12.3, 6.1$)
	H-6	3.55 - 3.59 (sa)	3.55 - 3.57 (m)	3.58 (dd, $J = 12.4, 6.2$)	3.67 - 3.68 (m)	-
	H-6'	3.75 (sa)	3.63 - 3.65 (m)	3.76 (sa)	-	-

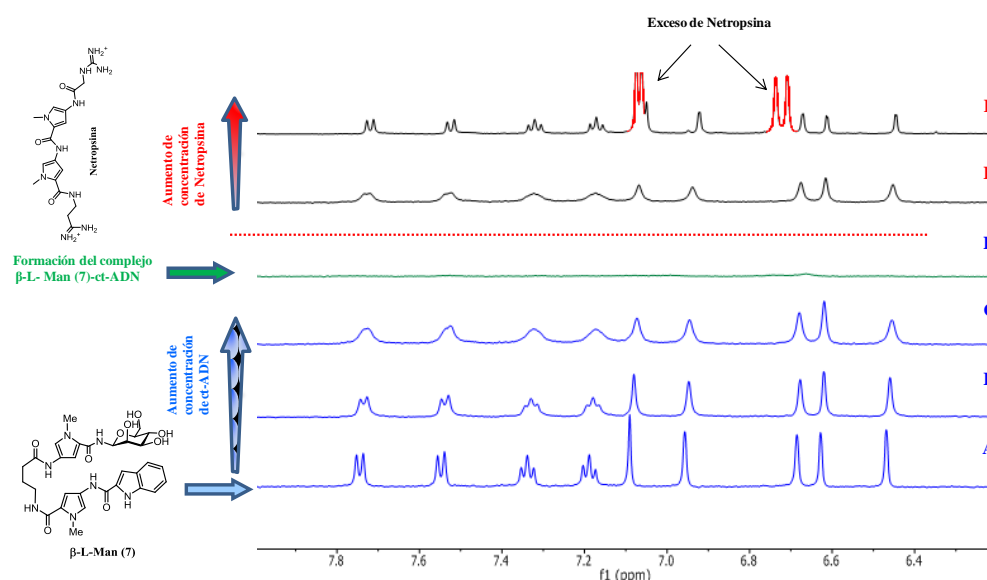


Figura 9.9. Experimento de competición entre la glico-oligoamida $\beta\text{-L-Man (7)}$ y Netropsina con ct-ADN: a) Ampliación de la región aromática del espectro ^1H NMR de **7** ($c=200 \mu\text{M}$) en ausencia de ADN; b) **7** ($c=250 \mu\text{M}$) en presencia de 28 μM (bp) de ct-ADN; c) **7** ($c=250 \mu\text{M}$) en presencia de 0.7 mM (bp) of ct-ADN; d) Formación del complejo: **7** ($c=250 \mu\text{M}$) en presencia de 4.5 mM bp de ct-ADN; e) **7** ($c=250 \mu\text{M}$) en presencia de 4.5 mM (bp) y 0.5 mg de Netropsina. Comienzan a aparecer, de nuevo, las resonancias de **7** en el espectro; f) **7** ($c=200 \mu\text{M}$) en presencia de 4.5 mM (bp) de ct-ADN y exceso de Netropsina (1.5 mg). Todos los espectros fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) a 25°C. Referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

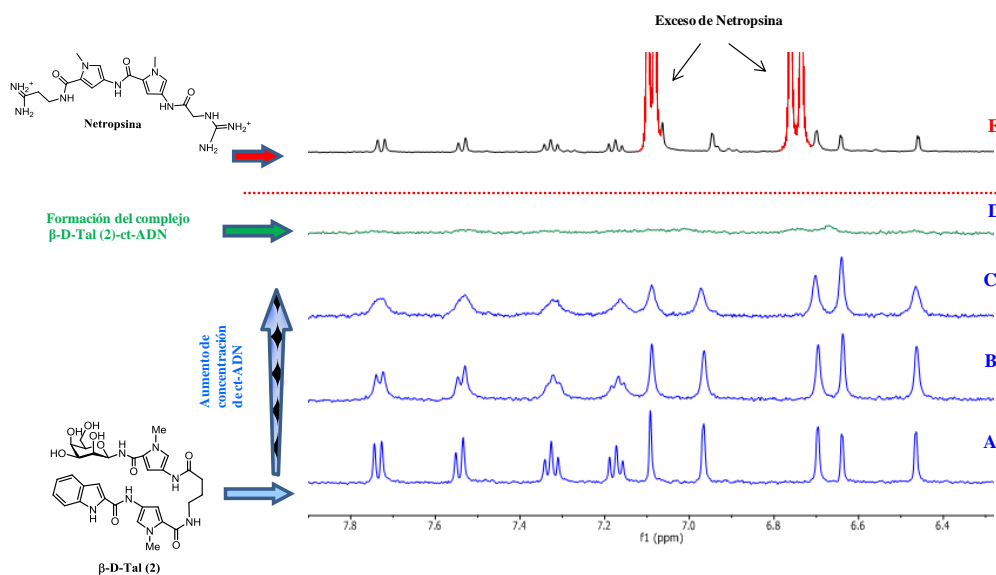


Figura 9.10. Experimento de competición entre la glico-oligoamida β -D-Tal (2) y Netropsina con ct-ADN: a) Ampliación de la región aromática del espectro $^1\text{H-NMR}$ de 2 ($c=300\ \mu\text{M}$) en ausencia de ADN; b) 2 ($c=300\ \mu\text{M}$) en presencia de 0.3 mM (bp) de ct-ADN; c) 2 ($c=300\ \mu\text{M}$) en presencia de 1.5 mM (bp) of ct-ADN; d) Formación del complejo: 2 ($c=300\ \mu\text{M}$) en presencia de 3.7 mM bp de ct-ADN; e) 2 ($c=300\ \mu\text{M}$) en presencia de 8.0 mM (bp) de ct-ADN y exceso de Netropsina (1.0 mg). Todos los espectros fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{ s}$) en D_2O tampón fosfato (6.1 mM Na_2HPO_4 , 3.9 mM NaH_2PO_4) a 25°C . Referencia TSP- d_4 (0.00 ppm).

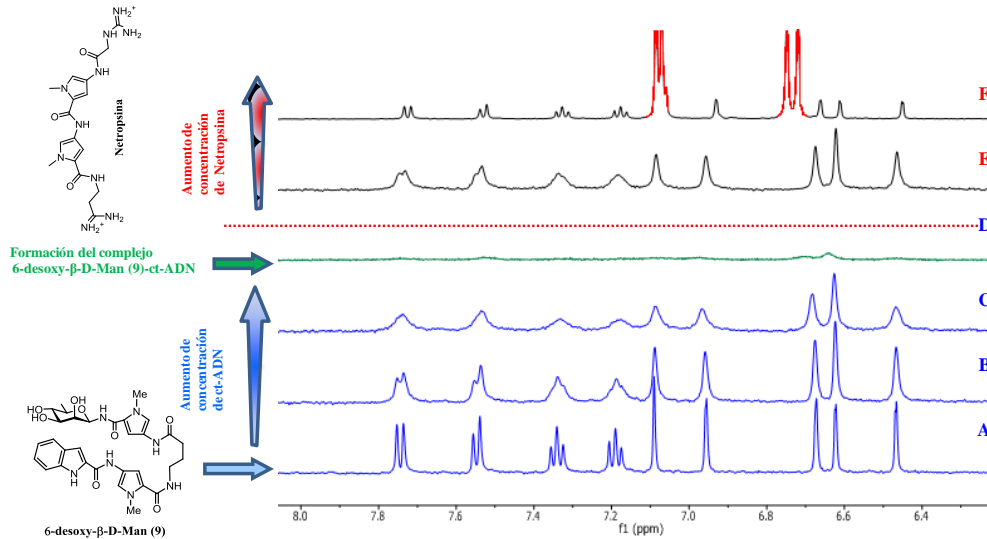


Figura 9.11. Experimento de competición entre la glico-oligoamida 6-desoxy- β -D-Man (9) y Netropsina con ct-ADN: a) Ampliación de la región aromática del espectro $^1\text{H-NMR}$ de 9 ($c=370\ \mu\text{M}$) en ausencia de ADN; b) 9 ($c=370\ \mu\text{M}$) en presencia de 1.0 mM (bp) de ct-ADN; c) 9 ($c=370\ \mu\text{M}$) en presencia de 4.1

mM (bp) of ct-ADN; d) Formación del complejo: **9** (c=370 μ M) en presencia de 8.5 mM bp de ct-ADN; e) **9** (c=370 μ M) en presencia de 8.5 mM (bp) y 0.3 mg de Netropsina. Comienzan a aparecer, de nuevo, las resonancias de **9** en el espectro; f) **9** (c=200 μ M) en presencia de 8.5 mM (bp) de ct-ADN y exceso de Netropsina (1.8 mg). Todos los espectros fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s) en D₂O tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

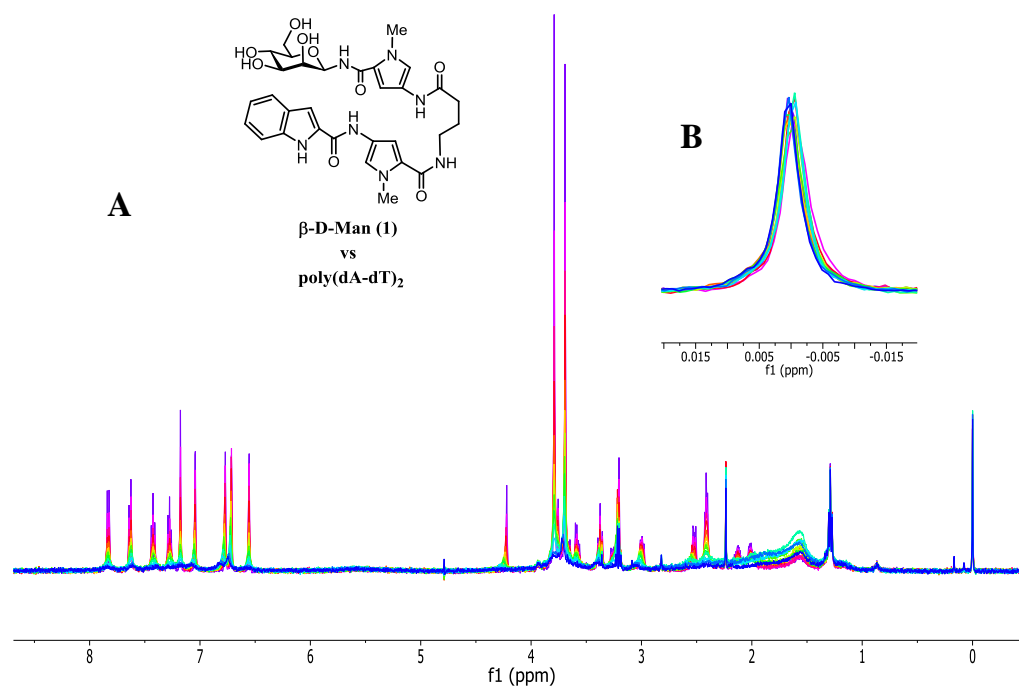


Figura 9.12. A) Superposición de espectros de la valoración de ¹H-RMN entre la glico-oligoamida **β -D-Man (1)** con poly(dA-dT)₂. Se registraron varios espectros a diferentes relaciones molares DNA/Ligando. Espectro violeta en ausencia de ADN. La concentración del ligando **1** (c= 200 μ M) se mantiene constante durante la valoración. B) Ampliación de la señal de la referencia TSP-d₄. Todos los espectros fueron adquiridos con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos (d1= 5s) en D₂O tampón fosfato (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

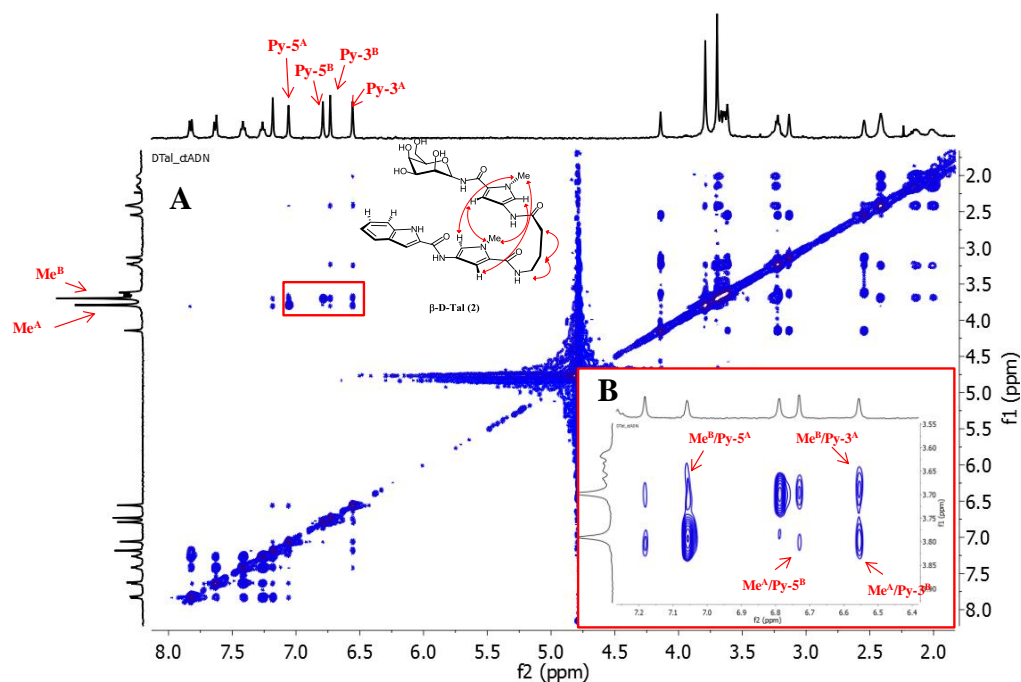


Figura 9.13. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de β -D-Tal (2) ($c=300 \mu\text{M}$) vs ct-ADN ($c=75 \mu\text{M}$) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

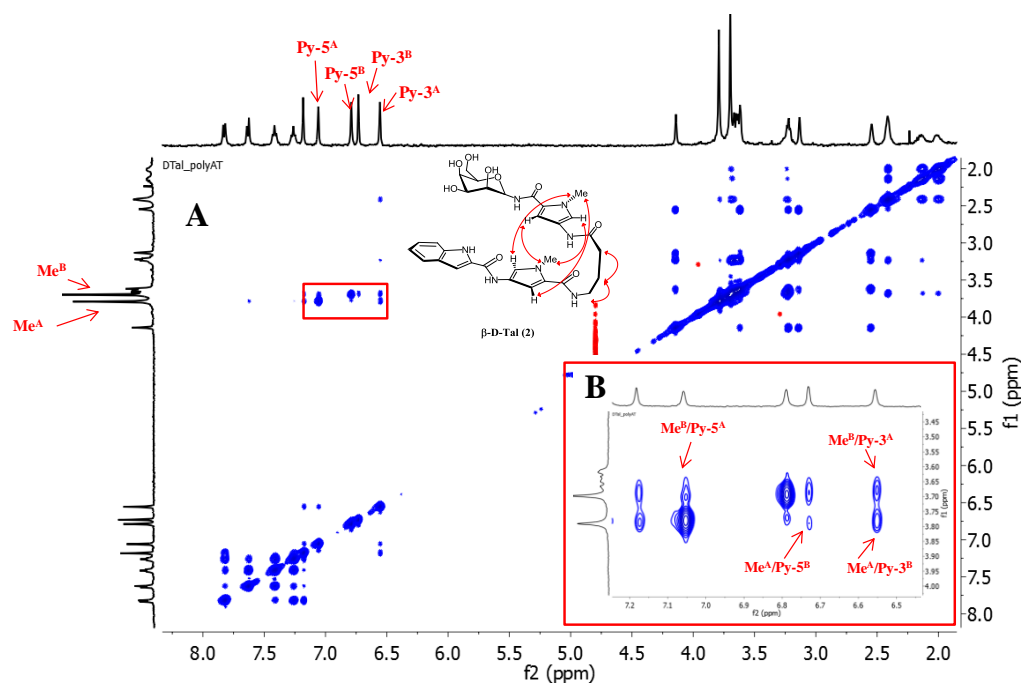


Figura 9.14. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de β -D-Tal (2) (c = 250 μ M) vs poly(dA-dT)₂ (c = 63 μ M) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra

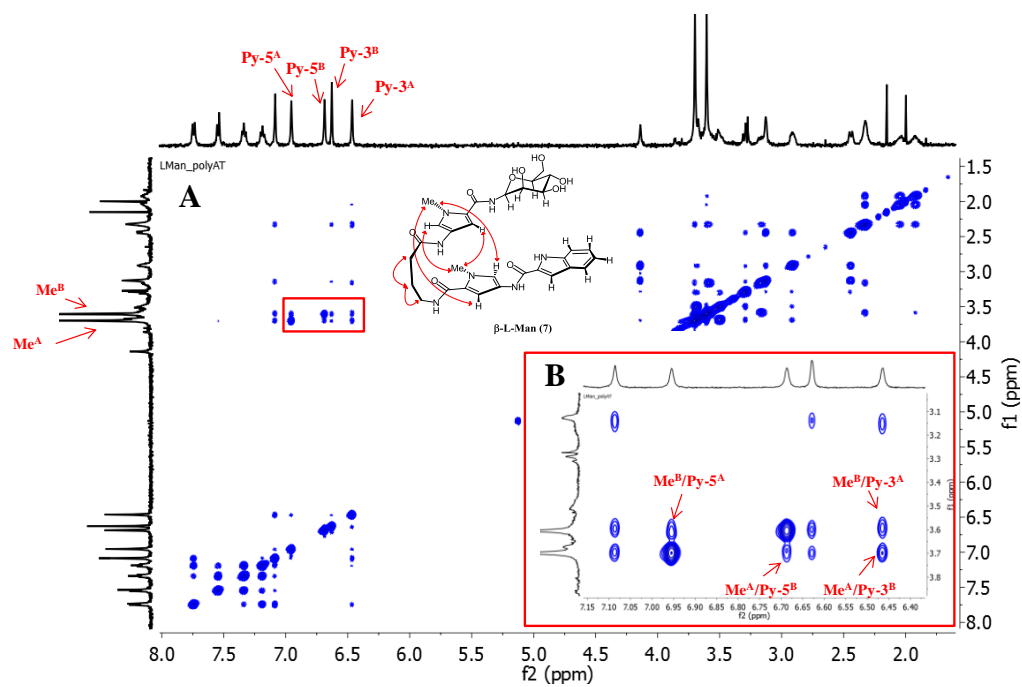


Figura 9.15. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de β -L-Man (7) ($c=300$ μ M) vs poly(dA-dT)₂ ($c=75$ μ M) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

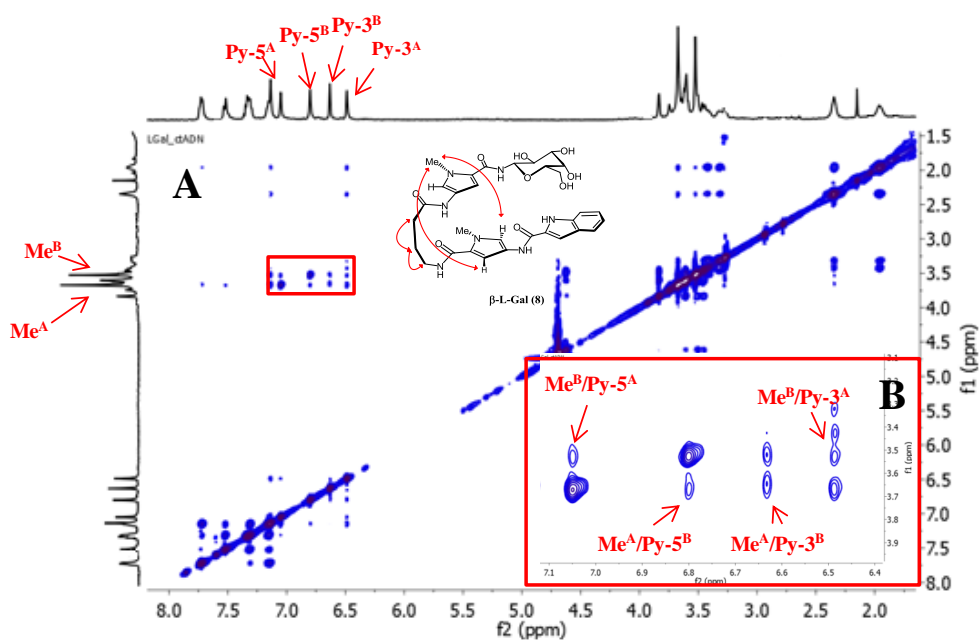


Figura 9.16. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de β -L-Gal (8) (c= 300 μ M) vs ct-ADN (c =75 μ M) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

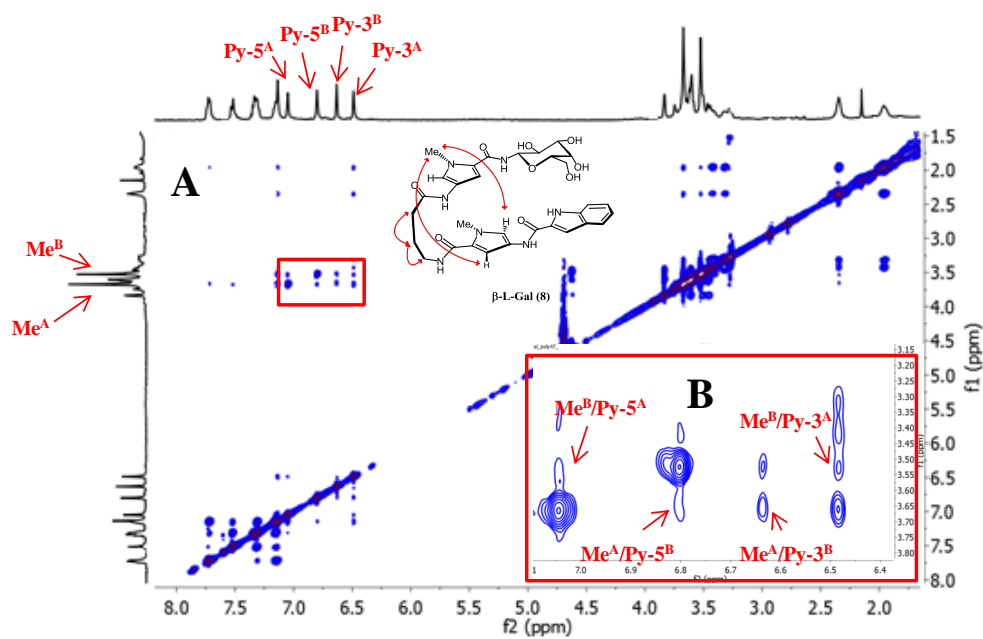


Figura 9.17. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de β -L-Gal (8) (c= 500 μ M) vs poly(dA-dT)₂ (c =125 μ M) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra

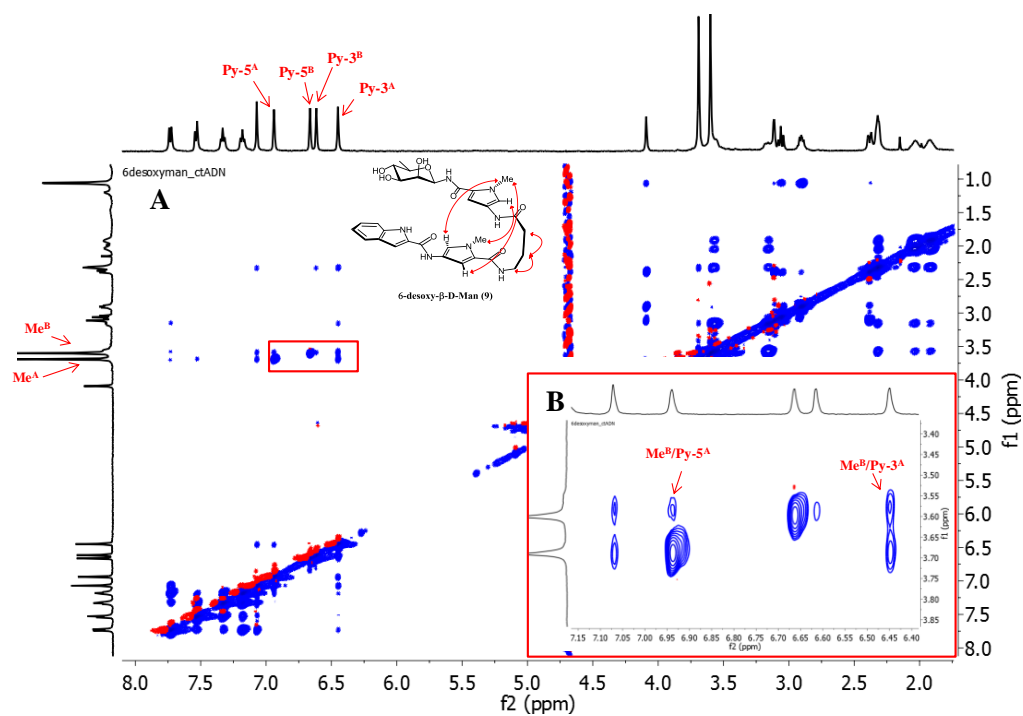


Figura 9.18. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de **6-desoxy-β-D-Man (9)** (c= 240 μM) vs ctADN (c =80 μM) (Ligando:ADN=3/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

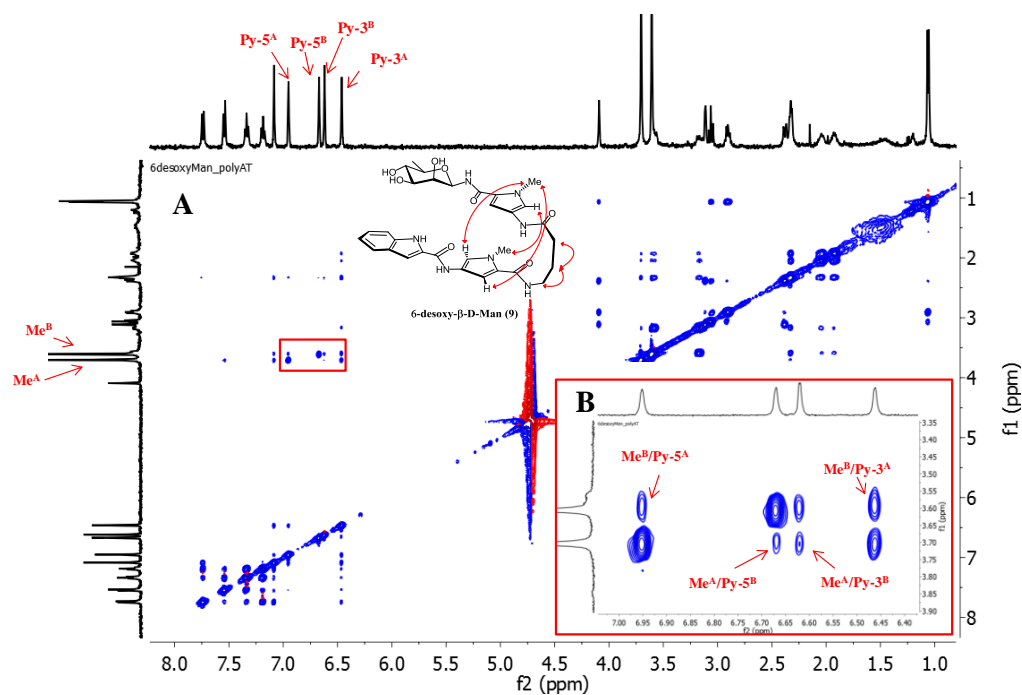


Figura 9.19. A) TR-NOESY (500MHz, $\tau_m=200$ ms, 25°C) de **6-desoxy-β-D-Man (9)** ($c=180$ μM) vs poly(dA-dT)₂ ($c=45$ μM) (Ligando:ADN=4/1) en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). B) Ampliación de la región donde se detectan nOes interhebra.

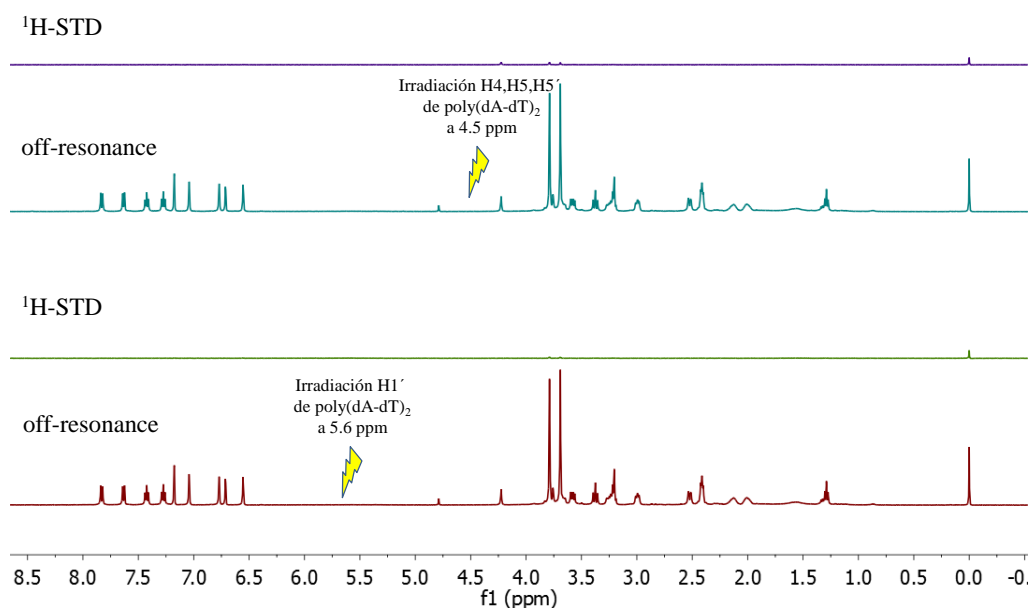


Figura 9.20. Experimento control ¹H-STD (500 MHz) a 5.6 y 4.5 ppm de **β-D-Man (1)** (c= 220 μM) en ausencia de ADN en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). Abajo: Espectro referencia, off-resonance (rojo) y espectro diferencia ¹H-STD (verde) irradiando en el interior del surco menor del ADN (a 5.6 ppm). Arriba: Espectro referencia, off-resonance (azul) y espectro diferencia ¹H-STD (violeta) irradiando en el exterior del surco menor del ADN (a 4.5 ppm). Para la saturación selectiva se utilizó un tiempo de saturación de global de 400 ms (L6=8) mediante un tren de 8 pulsos Gaussianos con una duración de 49 ms cada uno y 50 dB de atenuación, y con un “delay” entre ellos de 1 ms. Los experimentos fueron realizados con supresión de la señal residual de HDO, utilizando la secuencia de pulsos “3-9-19 watergate” con gradientes y añadiendo a la secuencia de pulsos un filtro T1ρ.

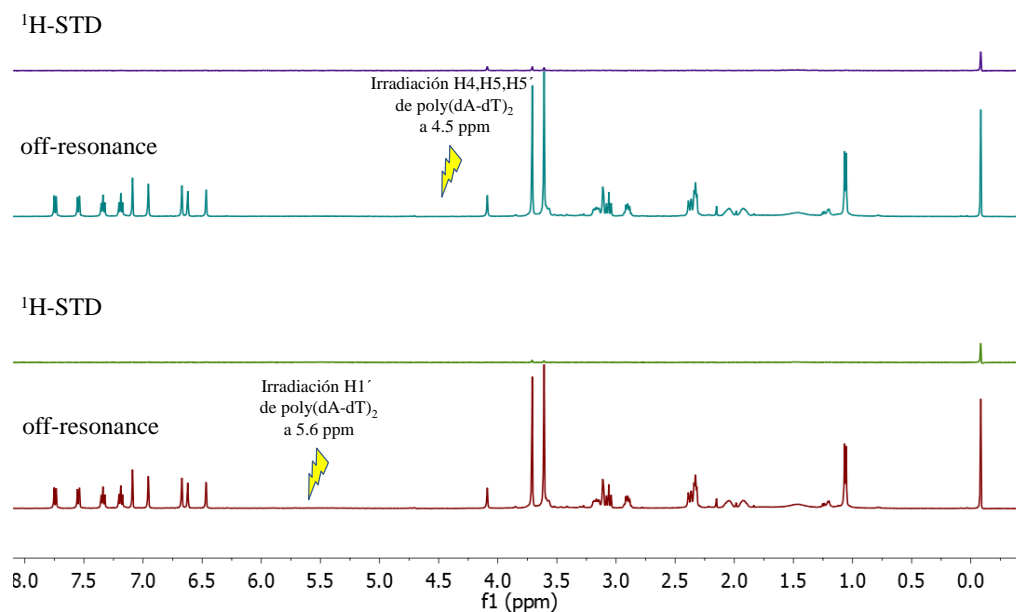


Figura 9.21. Experimento control ¹H-STD (500 MHz) a 5.6 y 4.5 ppm de 6-desoxy-β-D-Man (9) (*c*= 110 μM) en ausencia de ADN en D₂O (6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄) a 25°C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm). Abajo: Espectro referencia, off-resonance (rojo) y espectro diferencia ¹H-STD (verde) irradiando en el interior del surco menor del ADN (a 5.6 ppm). Arriba: Espectro referencia, off-resonance (azul) y espectro diferencia ¹H-STD (violeta) irradiando en el exterior del surco menor del ADN (a 4.5 ppm). Para la saturación selectiva se utilizó un tiempo de saturación de global de 400 ms (L6=8) mediante un tren de 8 pulsos Gaussianos con una duración de 49 ms cada uno y 50 dB de atenuación, y con un “delay” entre ellos de 1 ms. Los experimentos fueron realizados con supresión de la señal residual de HDO, utilizando la secuencia de pulsos “3-9-19 watergate” con gradientes y añadiendo a la secuencia de pulsos un filtro T1ρ.

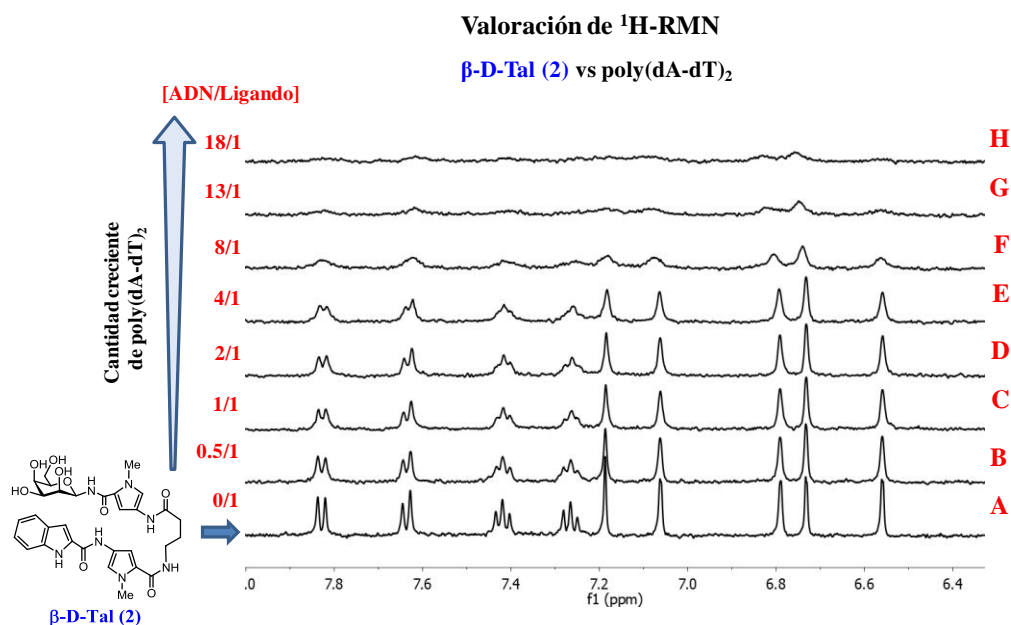


Figura 9.22. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida β -D-Tal (2) con poly(dA-dT) $_2$. En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando, (desde 0 hasta 18, A-H), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de 2 ($c=90\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT) $_2$: Espectros B-H: B) $45\ \mu\text{M}$ (bp), C) $90\ \mu\text{M}$ (bp), D) $180\ \mu\text{M}$ (bp), E) $360\ \mu\text{M}$ (bp), F) $720\ \mu\text{M}$ (bp), G) $1170\ \mu\text{M}$ (bp), H) $1620\ \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT) $_2$. Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando 2 con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP-d4 ($0.00\ \text{ppm}$).

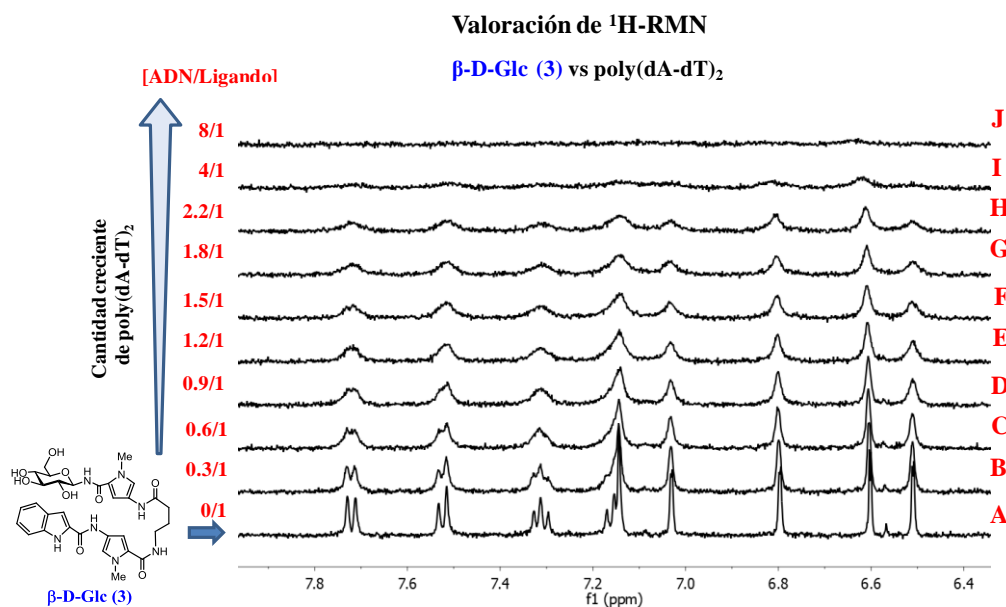


Figura 9.23. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida β -D-Glc (3) con poly(dA-dT)₂. En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando, (desde 0 hasta 8, A-J), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de 3 ($c=100\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂: Espectros B-J: B) $30\ \mu\text{M}$ (bp), C) $60\ \mu\text{M}$ (bp), D) $90\ \mu\text{M}$ (bp), E) $120\ \mu\text{M}$ (bp), F) $150\ \mu\text{M}$ (bp), G) $180\ \mu\text{M}$ (bp), H) $220\ \mu\text{M}$ (bp), I) $400\ \mu\text{M}$ (bp), J) $800\ \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT)₂. Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando 3 con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{ s}$) en D_2O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP- d_4 ($0.00\ \text{ppm}$).

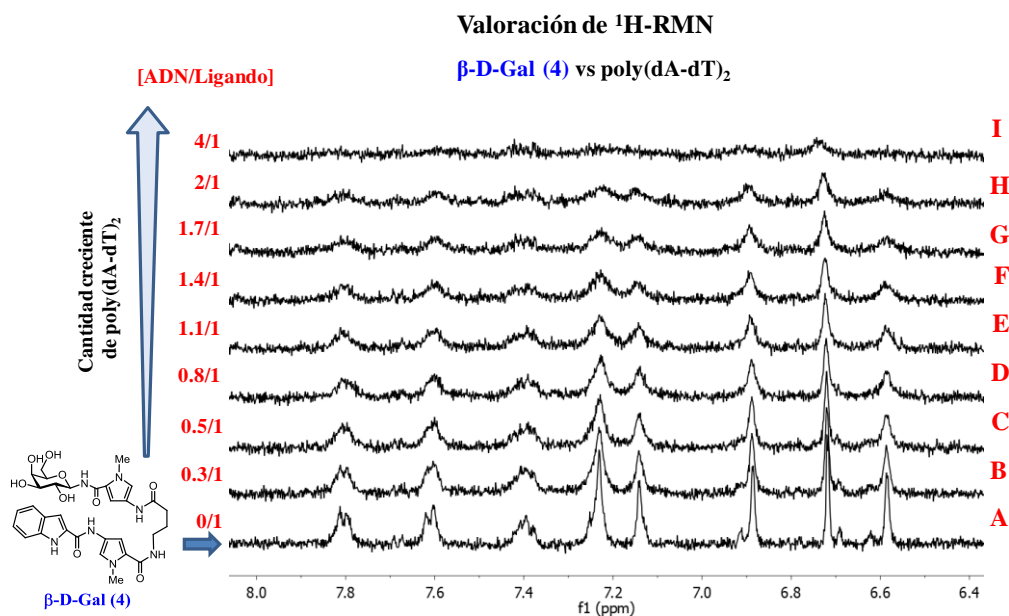


Figura 9.24. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida $\beta\text{-D-Gal (4)}$ con poly(dA-dT)_2 . En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando, (desde 0 hasta 4, A-I), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de **4** ($c=150\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT)_2 : Espectros B-I: B) $45\ \mu\text{M}$ (bp), C) $75\ \mu\text{M}$ (bp), D) $120\ \mu\text{M}$ (bp), E) $165\ \mu\text{M}$ (bp), F) $210\ \mu\text{M}$ (bp), G) $255\ \mu\text{M}$ (bp), H) $300\ \mu\text{M}$ (bp), I) $600\ \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT)_2 . Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando **4** con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP-d4 (0.00 ppm).

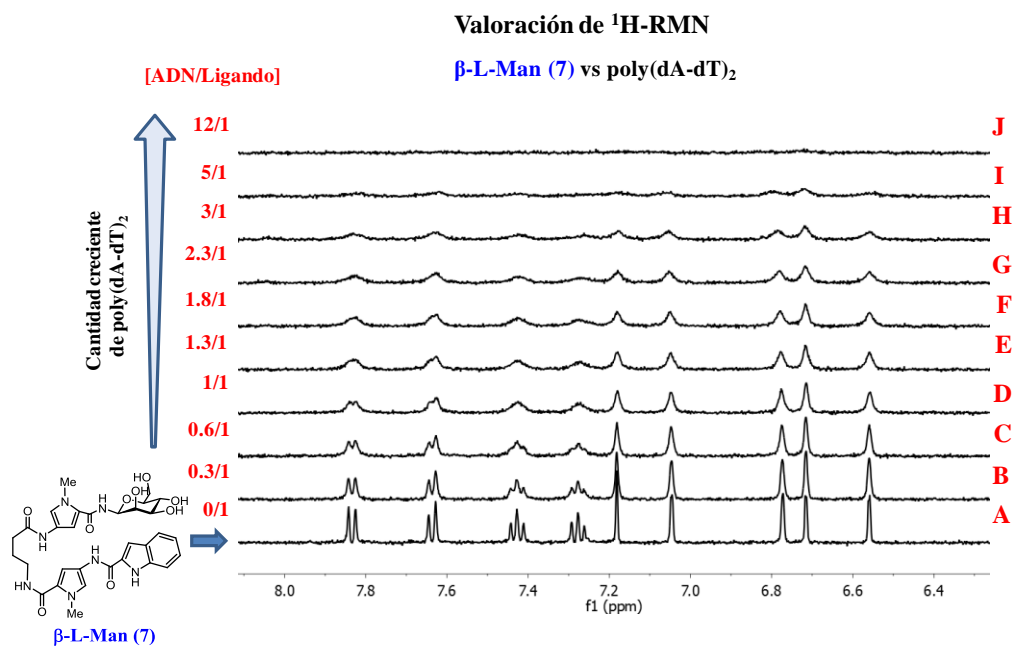


Figura 9.25. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida **β -L-Man (7)** con poly(dA-dT)₂. En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando, (desde 0 hasta 12, A-J), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de **7** ($c=100\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT)₂: Espectros B-J: B) $30\ \mu\text{M}$ (bp), C) $60\ \mu\text{M}$ (bp), D) $100\ \mu\text{M}$ (bp), E) $130\ \mu\text{M}$ (bp), F) $180\ \mu\text{M}$ (bp), G) $230\ \mu\text{M}$ (bp), H) $300\ \mu\text{M}$ (bp), I) $500\ \mu\text{M}$ (bp), J) $1200\ \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT)₂. Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando **7** con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D₂O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

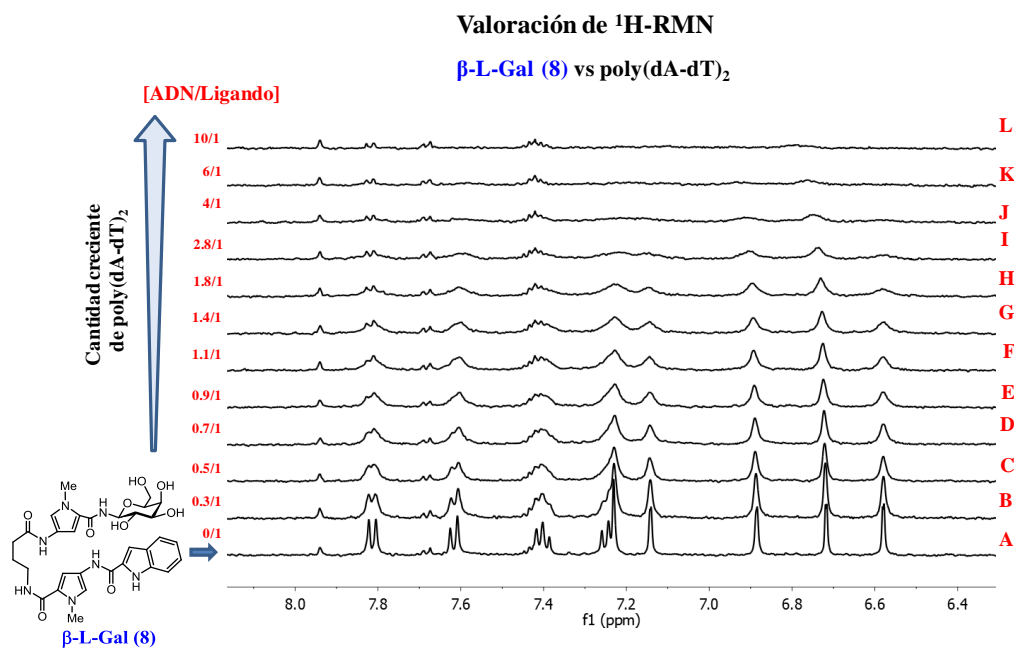


Figura 9.26. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida β -L-Gal (8) con poly(dA-dT) $_2$. En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando, (desde 0 hasta 12, A-L), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de **8** ($c=180\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT) $_2$: Espectros B-L: B) $54\ \mu\text{M}$ (bp), C) $90\ \mu\text{M}$ (bp), D) $126\ \mu\text{M}$ (bp), E) $162\ \mu\text{M}$ (bp), F) $198\ \mu\text{M}$ (bp), G) $234\ \mu\text{M}$ (bp), H) $324\ \mu\text{M}$ (bp), I) $504\ \mu\text{M}$ (bp), J) $720\ \mu\text{M}$ (bp), K) $1080\ \mu\text{M}$ (bp), L) $1800\ \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT) $_2$. Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando **8** con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP- d_4 ($0.00\ \text{ppm}$).

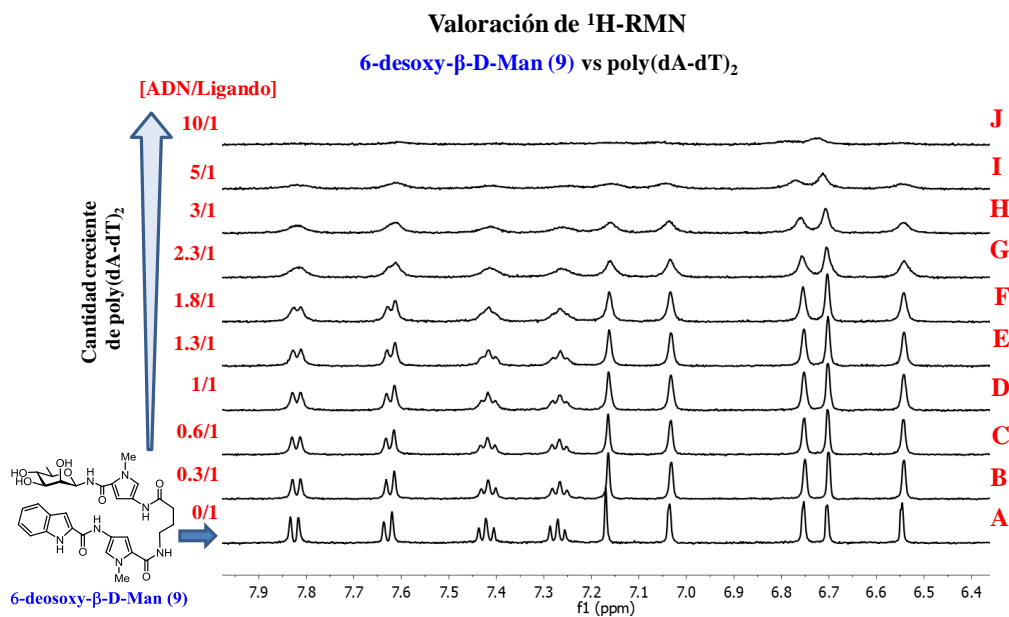
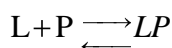


Figura 9.27. Valoración de ^1H -RMN entre la glico-oligoamida **6-desoxy- β -D-Man (9)** con poly(dA-dT) $_2$. En la figura se muestran las ampliaciones de las regiones aromáticas de varios espectros a diferentes relaciones molares ADN/Ligando, (desde 0 hasta 10, A-J), en ausencia de ADN: A) Espectro de ^1H -NMR de **9** ($c=170\ \mu\text{M}$); y en presencia de cantidades crecientes de poly(dA-dT) $_2$: Espectros B-J: B) $51\ \mu\text{M}$ (bp), C) $102\ \mu\text{M}$ (bp), D) $170\ \mu\text{M}$ (bp), E) $221\ \mu\text{M}$ (bp), F) $306\ \mu\text{M}$ (bp), G) $391\ \mu\text{M}$ (bp), H) $510\ \mu\text{M}$ (bp), I) $850\ \mu\text{M}$ (bp), J) $10\ \mu\text{M}$ (bp) de poly(dA-dT) $_2$. Todos los espectros fueron adquiridos manteniendo constante la concentración de ligando **9** con 64 scans a 500 MHz utilizando un tiempo de espera entre pulsos de 5 segundos ($d1=5\text{s}$) en D_2O tampón fosfato ($6.1\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $3.9\ \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$) a 25°C . Referencia TSP- d_4 ($0.00\ \text{ppm}$).

Análisis de los datos de la valoración por ^1H -RMN de las glico-oligoamidas con poly(dA-dT)₂:

En este procedimiento se estimarán un valor de las constantes de disociación mediante el seguimiento de la disminución de las intensidades de pico de RMN de las resonancias del ligando al añadir concentraciones crecientes de ADN, manteniendo constante en todo momento a lo largo de la valoración la concentración de ligando. Si asumimos que la glico-oligoamida (L, ligando), interacciona con el poly(dA-dT)₂ (P, polímero de ADN) en un equilibrio del tipo 1:1, la constante del equilibrio de disociación para ésta interacción se puede expresar por medio de la **Ecuación A.1**:



L = ligando

P = Polímero de ADN

LP = complejo

$$K_D = \frac{[\text{L}] \cdot [\text{P}]}{[\text{LP}]}$$

[L] = concentración de ligando libre en disolución en el equilibrio

[P] = concentración de ADN libre en disolución en el equilibrio

[LP] = concentración de complejo en el equilibrio

Ecuación A.1

La fracción molar de ligando unido se puede expresar en términos de K_D y [P] (Ver **Ecuación A.2**).

$$\chi_{LP} = \frac{[\text{LP}]}{[\text{L}]_{\text{total}}} = \frac{[\text{LP}]}{[\text{L}] + [\text{LP}]} \Rightarrow \text{Fracción molar de ligando unido en disolución}$$

$$\left. \begin{aligned} [\text{LP}] &= \frac{[\text{L}] \cdot [\text{P}]}{K_D} \\ \chi_{LP} &= \frac{[\text{LP}]}{[\text{L}]_{\text{total}}} = \frac{[\text{LP}]}{[\text{L}] + [\text{LP}]} \end{aligned} \right\} \chi_{LP} = \frac{[\text{L}] \cdot [\text{P}]}{K_D \cdot ([\text{L}] + [\text{LP}])} = \frac{[\text{P}]}{K_D + [\text{P}]}$$

$$\chi_{LP} = \frac{[\text{L}] \cdot [\text{P}]}{K_D \cdot ([\text{L}] + [\text{LP}])} = \frac{[\text{P}]}{K_D + [\text{P}]}$$

Ecuación A.2

La **Ecuación A.2** se puede expresar en términos de concentración de ADN total añadido durante valoración ($[P]_{total}$) mediante la aproximación:

$$[P]_{total} = [P] + [PL] \Rightarrow [P] = [P]_{total} - [PL]$$

$$\text{Aproximación: Si } [P]_{total} \gg [PL] \text{ entonces } [P] \approx [P]_{total}$$

De forma que la fracción molar del ligando unido se puede expresar en términos de KD y $[P]_{total}$ (**Ecuación A.3**).

$$\chi_{LP} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \approx \frac{[P]_{total}}{K_D + [P]_{total}}$$

Ecuación A.3

Por otro lado, el decrecimiento de la intensidad de la señal de RMN del ligando al añadir cantidades crecientes de macromolécula puede servir para monitorizar la formación del complejo y por lo tanto la fracción de ligando unido al ADN (χ_{LP}).

La unión de un ligando a una macromolécula induce un ensanchamiento de la anchura de línea de pico y por lo tanto una disminución en la intensidad de la señal de RMN del ligando, porque el ligando unido experimenta un tiempo de relajación menor que el ligando libre.

La anchura de línea de RMN depende del tiempo de relajación transversal (T_2) según la **Ecuación A.4**:

$$\frac{1}{T_2} = \pi \cdot \Delta\nu_{1/2}$$

T_2 = tiempo de relajación transversal

$\Delta\nu_{1/2}$ = anchura de línea a la mitad de altura de pico

Ecuación A.4

El tiempo de relajación transversal observado (T_{2obs}) en un proceso de intercambio entre dos estados para una resonancia se puede expresar según la **Ecuación A.5**:

$$\frac{1}{T_{2obs}} = \chi_L \frac{1}{T_{2L}} + \chi_{LP} \frac{1}{T_{2LP}} + \frac{\chi_L^2 \cdot \chi_{LP} \cdot \Delta\delta^2}{K_{off}}$$

T_{2L} = tiempo de relajación transversal del ligando en el estado libre

T_{2LP} = tiempo de relajación transversal del ligando en el estado asociado

$\Delta\delta = \delta_L - \delta_{LP}$ = diferencias de desplazamientos químicos del ligando entre el estado libre y asociado

Ecuación A.5

Por lo tanto el cambio de la anchura de línea de las resonancias del ligando a lo largo de la valoración se puede expresar mediante la **Ecuación A.6**.

$$\Delta\nu_{obs} = \chi_L \cdot \Delta\nu_L + \chi_{LP} \cdot \Delta\nu_{LP} + \Delta\nu_{intercambio}$$

$\Delta\nu_L$ = anchura de línea del ligando en el estado libre

$\Delta\nu_{LP}$ = anchura de línea del ligando en el estado asociado

Ecuación A.6

Si el proceso de intercambio es rápido el término de anchura de línea debido al intercambio en la **Ecuación A.6** es próximo a cero ($\Delta\nu_{intercambio} \approx 0$) simplificándose la expresión a la **Ecuación A.7**.

$$\Delta\nu_{obs} = \chi_L \cdot \Delta\nu_L + \chi_{LP} \cdot \Delta\nu_{LP}$$

Ecuación A.7

Relación de anchura de línea con intensidad de pico

Existe una relación entre la anchura de línea observada a lo largo de la valoración y la intensidad de la señal de RMN del ligando libre en disolución si la concentración de ligando es constante a lo largo de toda la valoración y estamos en la situación de intercambio rápido. Por lo tanto, la anchura de pico es inversamente proporcional a la intensidad de la señal de RMN observada del ligando.

$$A \propto I \cdot \Delta\nu \Rightarrow \Delta\nu \propto \frac{A}{I}$$

A = integral del pico

I = intensidad de pico

$\Delta\nu$ = anchura de línea de pico

La Ecuación A.7 del cambio de la anchura de línea, de las resonancias del ligando durante la valoración se puede expresar en términos de intensidad de la señal de pico observado mediante la **Ecuación A.8**:

$$\frac{1}{I_{obs}} = \chi_L \cdot \frac{1}{I_L} + \chi_{LP} \cdot \frac{1}{I_{LP}}$$

I_L = intensidad de pico del ligando libre sin ADN, es decir cuando $[L] = [L]_{total}$

I_{LP} = intensidad de pico del ligando cuando $[LP] = [L]_{total}$

Ecuación A.8

La Ecuación A.8 se puede expresar en término de la fracción de ligando unido al ADN (χ_{LP}) (Ecuación A.9).

$$\frac{I_L}{I_{obs}} = \chi_L + \chi_{LP} \cdot \frac{I_L}{I_{LP}} = (1 - \chi_{LP}) + \chi_{LP} \cdot \frac{I_L}{I_{LP}} = 1 + \chi_{LP} \left(\frac{I_L}{I_{LP}} - 1 \right)$$

Ecuación A.9

Donde reagrupando términos se puede definir el parámetro de anchura de línea “c” tanto en términos de intensidad como de anchura de línea, debido a la proporcionalidad existente entre ambos.

$$c = \left(\frac{I_L}{I_{LP}} - 1 \right) = \left(\frac{\Delta\nu_{LP}}{\Delta\nu_L} - 1 \right)$$

I_L = intensidad de pico del ligando libre sin ADN, es decir cuando $[L] = [L]_{total}$

I_{LP} = intensidad de pico del ligando cuando $[LP] = [L]_{total}$

$\Delta\nu_L$ = anchura de línea de pico del ligando en el estado libre sin ADN

$\Delta\nu_{LP}$ = anchura de línea de pico del ligando en el estado asociado

Ecuación A.10

Por lo tanto, sustituyendo la Ecuación A.10 en la Ecuación A.9 se obtiene la relación de intensidades (I_L/I_{obs}) expresada en función de la fracción de ligando unido al ADN (χ_{LP}) y del parámetro “c”.

$$\frac{I_L}{I_{obs}} = 1 + \chi_{LP} c$$

Ecuación A.11

Sustituyendo la **Ecuación A.11** en la **Ecuación A.3** y reagrupando términos se obtiene la expresión de la isoterma de unión en términos de la intensidad relativa observada (I_{obs}/I_L) la constante de disociación (K_D), de la concentración total de ADN añadido durante la valoración ($[P]_{total}$) y del parámetro adimensional “c”.

$$\frac{I_{obs}}{I_L} = \frac{1}{1 + \frac{c \cdot [P]_{total}}{[P]_{total} + K_D}}$$

Ecuación A.12

Tabla 9.13. Valores de %_{STD} sin normalizar irradiando a 5.6 y 4.5 ppm en los complejos de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** con ct-ADN.

[illegible]

Tabla 9.14. Valores de %_{STD} sin normalizar irradiando a 5.6 y 4.5 ppm en los complejos de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** con poly(dA-dT)₂.

[illegible]

Tabla 9.15. Valores de I_f/I_d de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** en los experimentos STD de los complejos formados con ct-ADN después de normalizar a la señal de Py-3^A.

	$I_f/I_d_{(1)}$	$I_f/I_d_{(2)}$	$I_f/I_d_{(7)}$	$I_f/I_d_{(8)}$	$I_f/I_d_{(9)}$
In-4	1.01	1.13	1.16	0.87	1.00
In-7	1.11	1.41	0.99	0.72	1.08
In-6	0.95	1.39	0.99	0.72	0.95
In-5	0.92	1.22	1.01	0.87	1.01
In-3	1.03	1.19	1.06	1.09	1.00
Py-5 ^A	1.21	1.26	1.09	0.87	1.01
Py-5 ^B	1.09	0.71	1.03	0.96	0.98
Py-3 ^B	0.94	0.72	1.01	0.79	0.99
Py-3 ^A	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CH3-A	1.37	6.99	1.85	1.21	1.76
CH3-B	1.41	21.48	1.66	4.34	7.33
γ_a	1.41	3.01	1.66	1.17	1.65
γ_a'	1.58	2.93	1.38	1.28	1.61
γ_b	0.99	*	1.25	0.95	1.55
γ_b'	0.84	*	1.25	0.95	1.17
γ_c	0.81	1.59	1.11	0.71	1.26
H-1	1.75	1.09	0.66	*	1.48
H-2	1.58	4.08	1.49	0.36	1.63
H-3	1.98	2.47	1.58	1.15	1.62
H-4	1.48	4.22	1.22	2.05	1.38
H-5	2.22	2.93	1.67	0.87	1.96
H-6	1.37	3.01	1.85	0.36	*
H-6'	1.13	3.01	1.83	0.36	*
Me	*	*	*	*	1.21

Tabla 9.16. Valores de I_f/I_d de las glico-oligoamidas **1**, **2** y **7-9** en los experimentos STD de los complejos formados con poly(dA-dT)₂.

	$I_f/I_d_{(1)}$	$I_f/I_d_{(2)}$	$I_f/I_d_{(7)}$	$I_f/I_d_{(8)}$	$I_f/I_d_{(9)}$
In-4	1.03	1.11	1.10	1.11	1.02
In-7	1.13	1.01	1.10	0.97	1.03
In-6	1.03	1.14	1.00	1.14	1.03
In-5	0.94	1.04	1.00	1.03	0.96
In-3	1.03	1.05	1.00	1.03	0.97
Py-5 ^A	1.66	1.29	1.10	1.06	1.15
Py-5 ^B	1.03	1.12	1.00	1.07	0.94
Py-3 ^B	1.03	1.03	1.00	1.10	0.97
Py-3 ^A	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CH3-A	1.40	1.54	1.50	1.25	1.95
CH3-B	1.58	1.56	1.71	1.25	2.32
γa	1.37	1.54	1.34	1.62	1.19
γa'	1.37	1.41	1.21	1.15	1.42
γb	0.93	1.24	1.20	1.04	1.17
γb'	0.93	1.24	1.20	*	1.17
γc	1.03	0.99	1.10	0.93	1.05
H-1	3.46	1.62	1.65	*	3.61
H-2	1.48	1.79	1.48	1.84	1.60
H-3	2.17	1.96	1.47	1.62	1.29
H-4	1.67	1.93	1.32	1.76	1.68
H-5	1.67	1.41	1.79	1.07	1.27
H-6	1.18	1.54	1.46	1.84	*
H-6'	1.11	1.54	1.78	1.84	*
Me	*	*	*	*	1.54

(1) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*; Jhon Wiley & Sons, England. 1999.